

# **Der Einfluss von getrockneten Heidelbeeren und deren Anthocyanen auf die Colitis**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der  
naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und  
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg



# **Der Einfluss von getrockneten Heidelbeeren und deren Anthocyanen auf die Colitis**



## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der  
Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.) der  
naturwissenschaftlichen Fakultät III – Biologie und  
Vorklinische Medizin der Universität Regensburg

vorgelegt von

**Heidi Piberger**

2009

**Promotionsgesuch eingereicht am:**

29.07.2009

**Die Arbeit wurde angeleitet von:**

Prof. Dr. med. Dr. phil. G. Rogler, Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie,  
Department für Innere Medizin, Universitätsspital Zürich

PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum  
Regensburg

**Prüfungsausschuss:**

Vorsitzender:	Prof. Dr. rer. nat. Wolfgang Seufert
1. Gutachter (1. Prüfer):	PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann
2. Gutachter (2. Prüfer):	Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler
3. Prüfer:	Prof. Dr. med. Richard Warth
Ersatzprüfer:	Prof. Dr. rer. nat. Gernot Längst

# **Dissertation**

durchgeführt von März 2006 bis Juli 2009  
am Institut für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg  
unter Anleitung von

Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler  
Klinik für Gastroenterologie und Hepatologie, Department für Innere Medizin I ,  
Universitätsspital Zürich

und

PD Dr. rer. nat. Thomas Langmann  
Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Regensburg

Für meine Familie  
In Erinnerung an Papa

# Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
aqua bidest.	zweifach destilliertes Wasser
AS	Aminosäure
BCA	bicinchoninic acid solution
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin (Rinderserumalbumin)
bzw.	beziehungsweise
ca.	circa
cDNA	complementary DNA, „copy DNA“
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankungen
COX-2	Cyclooxygenase-2
CTSB	Cathepsin B
CTSD	Cathepsin D
CTSL	Cathepsin L
CU	Colitis ulcerosa
d	Tag
DAPI	4,6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
DSS	Dextran Sodium Sulfat
DTT	Dithiothreitol
ECL	enhanced chemoluminescence
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-linked-immunosorbent-assay
EtOH	Ethanol
FCS	Fetal calf serum (fötales Kälberserum)
GALT	gut-associated lymphoid tissue
gHB	getrocknete Heidelbeeren
h	Stunde
HRP	horseradish peroxidase (Meerrettich-Peroxidase)

IL	Interleukin
IMAC	intestinale Makrophagen
INF $\gamma$	Interferon gamma
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozyten Separations Medium
mA	Milliampere
MC	Morbus Crohn
MHC	major histocompatibilty complex
mg	Milligramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
MMP	Matrixmetalloproteinase
MOPS	3-Morpholinopropansulfonsäure
MW	Mittelwert
NADPH	Nikotinaminadenindinukleotidphosphat (reduziert)
nm	Nanometer
p	statistischer P-Wert (Irrtumswahrscheinlichkeit)
PAMPs	pathogen associated molecular patterns
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase Kettenreaktion)
PE	R-Phycoerythrin
PRRs	PAMP recognition receptors
P/S	Penicillin / Streptomycin
RNA	Ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)
rpm	rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
SDS	Sodium dodecyl sulfate
Tab.	Tabelle
TANK	TRAF associated NF- $\kappa$ B activator
TIMP	tissue inhibitor of metalloproteinase
TRAF	TNF-receptor-associated-factor
TBK1	TANK binding kinase
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase biotin-dUTP



# Inhaltsverzeichnis

<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
<b>1. EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
1.1. Der humane Darm	1
1.1.1. Aufbau und Funktion	1
1.1.2. Die Kolonmukosa	2
1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen	3
1.2.1. Morbus Crohn	4
1.2.2. Colitis ulcerosa	6
1.3. Molekulare Mechanismen der Mukosaschädigung bei CED	7
1.3.1. Makrophagen als zentrale Komponente des angeborenen Immunsystems	7
1.3.1.1. Das angeborene Immunsystem	7
1.3.1.2. Makrophagen	8
1.3.1.3. Differenzierung intestinaler Makrophagen	11
1.3.2. Störung des angeborenen Immunsystems als Prädispositionsfaktor	12
1.3.3. Faktoren der Mukosaschädigung	15
1.3.3.1. Der zentrale pro-entzündliche Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und seine Regulation	15
1.3.3.2. Mukosaschädigungen durch Proteasen	19
1.3.3.3. Gewebeschädigung durch ROS	21
1.4. Anti-entzündliche Substanzen	24
1.4.1. Steroide als Standard	24
1.4.2. Anthocyane und ihre potentielle Wirkung	26
1.5. Arbeitsziele	31
<b>2. MATERIAL</b>	<b>34</b>
2.1. Zellkultur	34
2.2. Zytokine	35
2.3. SDS-PAGE und Western Blot	35
2.3.1. RIPA-Lysepuffer	35
2.3.2. Proteinbestimmung	36
2.3.3. Größenmarker	36
2.3.4. SDS-PAGE	36
2.3.5. Proteintransfer (Blotten)	37
2.3.6. Immundetektion	37
2.3.7. Stripping	37
2.4. Antikörper	38
2.5. In vivo Experimente	38
2.6. Oligonukleotide	39
2.6.1. Oligonukleotide für Genotypisierung der Cathepsin-Knock-out Mäuse	39
2.6.2. Oligonukleotide für Real-Time PCR	39

<b>2.7.</b>	<b>Durchflusszytometrie (FACS)</b>	<b>40</b>
<b>2.8.</b>	<b>Färbungen</b>	<b>40</b>
<b>2.9.</b>	<b>Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)</b>	<b>40</b>
<b>2.10.</b>	<b>sonstige Puffer und Lösungen</b>	<b>42</b>
<b>2.11.</b>	<b>Geräte</b>	<b>42</b>
<b>2.12.</b>	<b>Sonstige Verbrauchsmaterialien</b>	<b>44</b>
<b>3.</b>	<b>METHODEN</b>	<b>46</b>
<b>3.1.</b>	<b>Zellkultur</b>	<b>46</b>
3.1.1.	Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen	46
3.1.1.1.	Isolierung humaner Lamina propria mononukleärer Zellen aus Resektaten	46
3.1.1.2.	Isolierung von Monozyten aus Blut	48
3.1.1.3.	Magnetische Zellsortierung	49
3.1.1.4.	Isolierung mesenterialer Lymphknotenzellen aus der Maus	50
3.1.2.	Zelllinien	51
3.1.3.	Gewinnung von Zellüberständen	51
3.1.4.	Gewinnung von Zellextrakten	52
3.1.4.1.	Zellextrakte für RNA-Gewinnung	52
3.1.4.2.	Zellextrakte für Proteingewinnung	52
3.1.5.	Zellzahlbestimmung	52
<b>3.2.</b>	<b>Genotypisierung von Cathepsin Knock-out Mäusen</b>	<b>53</b>
3.2.1.	DNA-Isolation	53
3.2.2.	Polymerasekettenreaktion (PCR)	54
3.2.3.	Agarose Gelelektrophorese	54
<b>3.3.</b>	<b>Western Blot</b>	<b>56</b>
3.3.1.	SDS-PAGE	56
3.3.2.	Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Blotten)	57
3.3.3.	Immundetektion der Proteine	57
3.3.4.	Strippen der Nitrocellulosemembran	58
<b>3.4.</b>	<b>RNA-Isolation</b>	<b>58</b>
3.4.1.	RNA-Isolation aus Zelllysaten	58
3.4.2.	RNA-Isolation aus Kolongewebe	59
<b>3.5.</b>	<b>RNA-Konzentrationsbestimmung</b>	<b>59</b>
<b>3.6.</b>	<b>Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)</b>	<b>60</b>
<b>3.7.</b>	<b>Real-Time-PCR mit Taqman®</b>	<b>61</b>
3.7.1.	Prinzip	61
3.7.2.	Durchführung	62
3.7.3.	Datenanalyse	63
<b>3.8.</b>	<b>Real-Time-PCR mit SYBR-Green</b>	<b>64</b>
3.8.1.	Prinzip	64
3.8.2.	Durchführung	65
<b>3.9.</b>	<b>Durchflusszytometrie</b>	<b>67</b>
3.9.1.	Methode	67

3.9.2.	Makrophagenreinheit	69
3.9.3.	Apoptosenachweis	69
3.9.3.1.	DNA-Färbung mit Propidiumiodid	70
3.9.3.2.	Zell-Zyklus-Analyse und Apoptose-Nachweis	71
<b>3.10.</b>	<b>Stoffwechselaktivitätstest</b>	<b>71</b>
<b>3.11.</b>	<b>Färbemethoden</b>	<b>72</b>
3.11.1.	Hämatoxylin-Eosin-Färbung	72
3.11.2.	DNA-Färbung mit Propidiumiodid	72
3.11.3.	TUNEL-Assay	72
<b>3.12.</b>	<b>Quantitative Messung von Proteinen</b>	<b>74</b>
3.12.1.	Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)	74
3.12.2.	Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	74
3.12.3.	Luminex®	75
3.12.4.	Western Blot	76
<b>3.13.</b>	<b>Experimentelle Colitis im Tiermodell</b>	<b>76</b>
3.13.1.	Tiermodell	76
3.13.2.	Cathepsin-Hemmung im akuten Colitis-Modell	77
3.13.3.	CTSB- bzw. -CTSD Knock-out in der chronischen Colitis	77
3.13.4.	Getrocknete Heidelbeeren und Anthocyanextrakt in der experimentellen Colitis	78
<b>3.14.</b>	<b>Histologischer Score</b>	<b>78</b>
<b>3.15.</b>	<b>Apoptotischer Score</b>	<b>79</b>
<b>3.16.</b>	<b>Statistische Auswertung</b>	<b>79</b>
<b>4.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>80</b>
<b>4.1.</b>	<b>Einfluss von Anthocyanen auf die humane Makrophagenzelllinie MM6</b>	<b>80</b>
4.1.1.	Welcher Signalweg wird in MM6 durch AC beeinflusst?	80
4.1.2.	Induzieren hohe AC-Konzentrationen Apoptose?	84
<b>4.2.</b>	<b>Einfluss von gHB und AC auf die experimentelle Colitis</b>	<b>87</b>
4.2.1.	Wirkung der gHB und AC bei der akuten DSS-Colitis	87
4.2.1.1.	Histologie bei der akuten Colitis	88
4.2.1.2.	Kolonlänge bei der akuten Colitis	90
4.2.1.3.	Zytokinsekretion bei der akuten Colitis	92
4.2.2.	Wirkung der gHB und deren AC bei der chronischen DSS-Colitis	94
4.2.2.1.	Histologie bei der chronischen Colitis	94
4.2.2.2.	Kolonlänge bei der chronischen Colitis	96
4.2.2.3.	Zytokinsekretion bei der chronischen Colitis	98
4.2.3.	Einfluss von gHB und AC auf die Apoptose	100
<b>4.3.</b>	<b>Einfluss von gHB und AC auf die Expression von Cathepsinen</b>	<b>103</b>
<b>4.4.</b>	<b>Hemmung der lysosomalen Cathepsin-Proteasen</b>	<b>106</b>
4.4.1.	Inhibition von CTSB und CTSL in der akuten DSS-Colitis	106
4.4.1.1.	Einfluss der CTS-Inhibition auf die Histologie	106
4.4.1.2.	Einfluss der CTS-Inhibition auf die Kolonlänge	107
4.4.1.3.	Einfluss der CTS-Inhibition auf die Zytokinsekretion	108
4.4.2.	Einfluss des CTSB bzw. CTSD Knock-outs auf die chronische DSS-Colitis	110
4.4.2.1.	Histologie	110
4.4.2.2.	Kolonlängen	111

4.4.2.3.	Zytokinsekretion	112
<b>4.5.</b>	<b>Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF-κB in intestinalen Makrophagen</b>	<b>114</b>
4.5.1.	Aufreinigung intestinaler Makrophagen	114
4.5.2.	Expression von TANK und TBK1	115
4.5.3.	Expressionsunterschiede von TANK und TBK1 nach TNF-Stimulation	117
4.5.4.	IL-6 Sekretionsunterschiede in IMAC und Monozyten	119
<b>5.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>122</b>
5.1.	Einfluss von gHB und AC bei der experimentellen Colitis	122
5.2.	Einfluss von gHB und AC auf die Apoptose	126
5.3.	Einfluss von AC auf humane Makrophagen	128
5.4.	Einfluss von gHB und AC auf die Expression von CTS	130
5.5.	Hemmung der lysosomalen Cathepsin-Proteasen	132
5.6.	Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF-κB in intestinalen Makrophagen	134
5.6.1.	Expression von TANK und TBK1	134
5.6.2.	Aktivierung von NFκB durch TNF	136
<b>6.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>137</b>
6.1.	Einfluss von gHB und AC bei der experimentellen Colitis	137
6.2.	Einfluss von AC auf die Makrophagenzelllinie MM6	138
6.3.	Hemmung der Cathepsin-Proteasen	139
6.4.	Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF-κB in IMAC und Monozyten	140
<b>7.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>141</b>
<b>8.</b>	<b>LITERATURVERZEICHNIS</b>	<b>143</b>
<b>9.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>159</b>
	Danksagung	162
	Eidesstattliche Erklärung	164

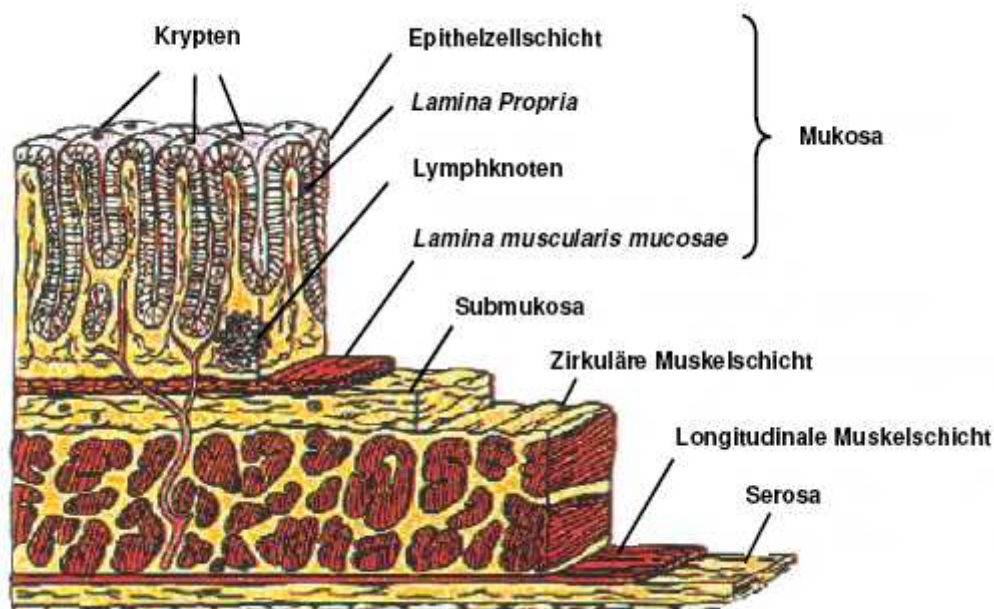
# 1. Einleitung

## 1.1. Der humane Darm

### 1.1.1. Aufbau und Funktion

Der menschliche Darm stellt mit einer Oberfläche von 400 m<sup>2</sup> die größte Kontaktfläche des Körpers mit der Außenwelt dar. Die Oberfläche der Darmschleimhaut ist somit 200-mal größer als die Haut und muss zwei gegensätzliche Funktionen erfüllen, die sich auch im Aufbau der Darmwand widerspiegeln. So muss der Darm permanent die Passage potentiell toxischer Stoffe und pathogener Mikroorganismen in den Wirt verhindern, aber die Aufnahme von Nährstoffen aus dem intestinalen Lumen in die Mukosa und die systemische Zirkulation zulassen.

Die Wand von Dünndarm und Dickdarm ist bis auf geringe Unterschiede gleichartig aus vier konzentrischen Schichten aufgebaut (Abb. 1.1).



**Abb. 1.1: Schematischer Aufbau der Darmwand** (adaptiert nach (1) ).

Das Lumen des Darms ist von einer spezialisierten Schleimhaut, der Mukosa, umgeben. Diese wird luminal von einer Schicht aus schleimbedeckten Epithelzellen begrenzt, die die unregelmäßigen Gewebserhebungen, die Zotten, und die dazwischen liegenden Gewebseinsenkungen, die Krypten, auskleiden. Aufgrund der Gewebserhebungen und – einsenkungen kommt es zu einer starken Oberflächenvergrößerung, dadurch wird eine möglichst effiziente Verdauung und Absorption von Nährstoffen im Dünndarm und eine optimale Regulation des Wasser – und Elektrolythaushalts im Dickdarm sichergestellt. Das Gewebe unter der Epithelzellschicht, die *Lamina propria*, die den größten Teil der Mukosa darstellt, wird von Lymphgefäßen, Blutgefäßen und Nervenbahnen durchzogen. Im Bindegewebe der *Lamina propria* befinden sich hauptsächlich Fibroblasten, Lymphozyten und Makrophagen. An die *Lamina propria* schließt sich die letzte Schicht der Mukosa, die *Lamina Muscularis mucosae* an, auf die dann die Submukosa folgt. Die *Muscularis mucosae* ist eine etwa fünfreihe Schicht aus glatten Muskelzellen, die für die Darmmotilität von besonderer Bedeutung ist. Die Submukosa verbindet durch ihre lose Maschenwerkstruktur aus dünnen Kollagenfibrillen die Mukosa mit der *Muscularis propria* und ist von Blutgefäßen und Lymphbahnen durchzogen. Unterhalb der Submukosa schließt sich eine Schicht aus Ring- und Längsmuskulatur an. Die Darmwand wird durch die Serosa begrenzt, die beim Dünndarm durch das Mesenterium an der hinteren Bauchwand befestigt ist (Mesenterialwurzel). Die vorherrschenden Bindegewebsproteine im Darm sind Kollagene, die von mesenchymalen Zellen wie glatten Muskelzellen und Fibroblasten produziert werden.

### 1.1.2. Die Kolonmukosa

Die dreischichtige Mukosa ist für die meisten physiologischen Funktionen des Darms verantwortlich. Die Mukosa des Dickdarms (Kolonmukosa) wird von einer einschichtigen Epithelzellschicht bedeckt. Die Zellen des Oberflächenepithels sind mit einer protektiven Schleimschicht überzogen und auf einer vom Stroma abgegrenzten Basalmembran fixiert. Sie kleiden das

gesamte Darmlumen samt der Gewebseinsenkungen, den Krypten, aus (Abb. 1.1). Jede Krypte besteht aus etwa 250 Epithelzellen, wobei die tatsächliche Anzahl von der anatomischen Lage der Krypte abhängt (2). Das Querschnittrelief der Kolonmukosa ist relativ flach und besitzt nur halbmondförmig ausgebildete Falten und Ausbuchtungen. Die Kolonmukosa ist durch eine exklusive Kriptenarchitektur, eine weitgehend parallele Anordnung der Krypten, ein becherzellreiches Epithel und ein leukozytenarmes Stroma gekennzeichnet. Das Oberflächenepithel besitzt einen Bürstensaum, der allerdings weit weniger ausgeprägt ist als im Dünndarm. Die Länge der Krypten nimmt von oral nach aboral hin zu (3).

## **1.2. Chronisch entzündliche Darmerkrankungen**

Zu den chronisch verlaufenden Darmerkrankungen zählen der Morbus Crohn (MC) und die Colitis ulcerosa (CU), an denen insbesondere junge Menschen zwischen dem 15. und dem 30. Lebensjahr erkranken. Allerdings gibt es zwischen dem 60. und 80. Lebensjahr einen weiteren Anstieg der Neuerkrankungsrate. Frauen sind dabei fast dreimal häufiger betroffen als Männer (4;5). Bei einer Prävalenz in Deutschland von 250-500/100.000 Einwohnern leiden derzeit ca. 300.000 Bundesbürger an chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) (6).

Die höchste Inzidenz von CED wird in Nordamerika und (Nord)- Europa beobachtet. In Südamerika, Asien und Afrika kommen hingegen wesentlich weniger Fälle vor, jedoch mit steigender Tendenz (7). Zudem werden neben den geographischen auch ethnische Unterschiede verzeichnet. In den USA sind Kaukasier deutlich häufiger betroffen als Afroamerikaner, letztere wiederum häufiger als Asiaten (8;9).

Die Ätiologie der CED ist bis heute, trotz zahlreicher Studien, noch nicht vollständig geklärt. Am ehesten sind diese Erkrankungen jedoch die Folge eines multifaktoriellen Geschehens, da bisher keine Einzelursachen nachgewiesen werden konnten. Diskutierte Einflussparameter sind dabei

Umwelteinflüsse, Ernährung, Störung des Darmmilieus, eine Dysregulation intestinaler Immunreaktionen, sowie genetische Prädisposition.

Aufgrund des zunehmenden Migrationsverhaltens und der steigenden Neuerkrankungsrate in den bisher gering prävalenten Gebieten wird vermutet, dass auch sozioökonomische Faktoren (Gesundheitswesen, Industrialisierung, sanitäre und hygienische Verhältnisse) eine Rolle bei der Ätiologie von CED spielen (10;11).

Beide Erkrankungen gehen mit einem Verlust der Mukosaintegrität, verminderter Resorptionsleistung und verstärkter Sekretion bzw. Exkretion von Flüssigkeiten einher. MC und CU unterscheiden sich durch eine Vielzahl klinischer und pathophysiologischer Veränderungen, auf die im Folgenden genauer eingegangen werden soll.

### **1.2.1. Morbus Crohn**

Beim MC kann sich die Entzündung über den gesamten Gastrointestinaltrakt von oral bis anal manifestieren. Am häufigsten sind jedoch der Dünn- und Dickdarm betroffen (Abb. 1.2). Ein typisches Merkmal des MC ist die transmurale Entzündung der Darmwand, wobei im Gegensatz zur CU alle Wandschichten betroffen sein können. Charakteristisch bei MC ist weiterhin der segmentale Befall des Darms, die so genannten diskontinuierlichen „Skip-Lesions“, mit abwechselnd gesunden und erkrankten Darmabschnitten.

Die Klinik ist sehr vielfältig und reicht von krampfartigen Bauchschmerzen bis zu rezidivierenden Diarrhöen mit bis zu 15 Stuhlgängen pro Tag, Fieber und Gewichtsverlust. Komplikationen können Fistel- und Stenosenbildung sein, die häufig ein operatives Eingreifen erfordern, welches jedoch die Rezidivgefahr und die Prognose nicht verbessern. Der Krankheitsverlauf ist chronisch schubweise. Eine Heilung der Erkrankung ist bisher nicht möglich. Die Therapie zielt häufig auf Immunsuppression und Remissionserhaltung ab.



### Morbus Crohn - Befallsmuster



**Abb. 1.2: Morbus Crohn – Befallsmuster** (Quelle: hdm-stuttgart.de).

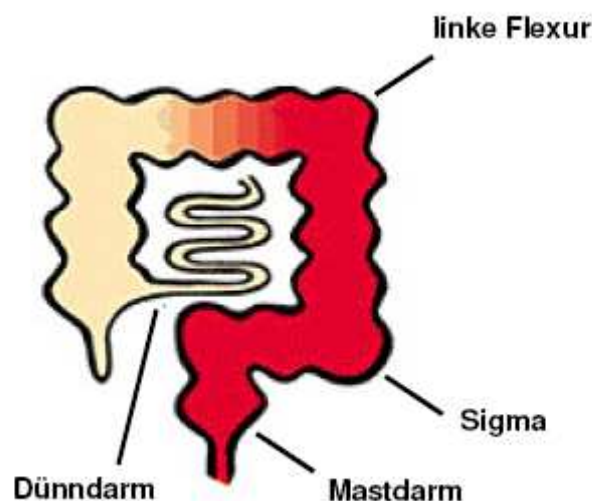
Wie bereits erwähnt, werden verschiedene ätiopathogenetische Faktoren, die für die Entstehung der CED verantwortlich sind, diskutiert. Es gilt jedoch als sicher, dass ein polygenetischer Hintergrund vorliegt, der zu einer familiären Häufung von MC beiträgt. Aus familiären Untersuchungen und Konkordanzstudien an Zwillingen kann auf eine genetische Prädisposition für MC geschlossen werden. Monozygote Geschwister haben bei Erkrankung ihrer Geschwistern ein im Vergleich zur Durchschnittsbevölkerung 15- bis 35-fach erhöhtes Risiko an MC zu erkranken (12;13). Durch Kopplungsanalysen ist es gelungen, Risikoregionen auf den Chromosomen 3, 7 und 11 zu identifizieren (14). Des Weiteren scheinen Mutationen im NOD2/CARD15-Gen (nucleotide-binding oligomerization domain containing 2/ caspase recruitment domain family, member 15) auf Chromosom 16 eine wichtige ätiopathogenetische Rolle bei MC zu spielen (15;16). Es codiert für einen intrazellulären Rezeptor, der bei der Erkennung von Pathogenen entscheidend mitwirkt. Kürzlich wurden weitere MC-assoziierte Gene identifiziert – OCTN (organic cation transporter) und

DLG5 (Drosophila melanogaster discs large homologue 5 gene), deren Mutationen in einer gestörten epithelialen Permeabilität resultieren (17;18), sowie ATG16L-1 (autophagy-related 16-like 1 gene), IL-23R und PPAR $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ) (19;20), deren Mutationen zu einer fehlerhaften Immunabwehr gegen Darmbakterien führen.

Auch Umwelteinflüsse wie Ernährungsgewohnheiten, Infektionen und Rauchen scheinen an der Entstehung der CED mitzuwirken (13;21;22). So ist Rauchen ein wichtiger Risikofaktor für einen aggressiven Krankheitsverlauf und das postoperative Rezidiv bei MC.

### 1.2.2. Colitis ulcerosa

Bei Patienten mit CU ist von der Entzündung nur die Dickdarmmukosa betroffen, weshalb man die Erkrankung auch als „mukosale Colitis“ bezeichnet. Die Entzündung beginnt dabei immer im Rektum. Sie kann auf das Rektum beschränkt bleiben, sich als klinisch linksseitige Colitis manifestieren oder sich in ca. 18% der Fälle kontinuierlich proximal über das gesamte Kolon ausbreiten (Abb. 1.3).



**Abb. 1.3: Colitis ulcerosa – Befallsmuster** (Quelle: [www.dccv.de](http://www.dccv.de)).

Auch bei der CU werden mehr oder minder lange Remissionsphasen von akuten Schüben unterbrochen. Die Klinik reicht von abdominellen Schmerzen bis hin zu Diarrhöen. Patienten mit starker Aktivität und großer Entzündungsausdehnung zeigen blutig-schleimige Diarrhöen mit einer Frequenz von bis zu 40 Stuhlgängen/Tag, Fieber, Dehydratation und Gewichtsverlust. Gefürchtete Komplikationen der CU sind das toxische Megakolon und Kolonkarzinome. Das Risiko, ein Kolonkarzinom zu entwickeln, steigt nach mehr als 10-jährigem Verlauf stark an. Die CU wird mit Immunsuppressiva therapiert und ist nur durch eine Kolo-Proktomie, d.h. durch operatives Entfernen des gesamten Dickdarms, heilbar.

Auch bei der CU haben familiäre Untersuchungen eine genetische Prädisposition bestätigt. CU-Patienten haben in 5,7-15,5% der Fälle einen CU erkrankten Verwandten ersten Grades. Die Übereinstimmung in Krankheitstyp, Krankheitsmuster und Präsenz extraintestinaler Manifestationen beträgt 80%, 64% und 70% (23). Interessanterweise scheint Rauchen nicht wie bei MC den Verlauf zu verschlimmern, sondern bewirkt einen protektiven Effekt auf die Krankheitsmanifestation (13).

### **1.3. Molekulare Mechanismen der Mukosaschädigung bei CED**

#### **1.3.1. Makrophagen als zentrale Komponente des angeborenen Immunsystems**

##### **1.3.1.1. Das angeborene Immunsystem**

Das Immunsystem wird in zwei große Teilbereiche gegliedert: das angeborene Immunsystem, welches phylogenetisch älter ist, und das adaptive Immunsystem. Das angeborene Immunsystem bildet eine erste Barriere gegen eindringende Pathogene und ist in der Lage, direkt auf einen Erreger zu reagieren, ohne mit diesem vorher schon einmal in Berührung gekommen zu sein, was eine schnelle Einsatzfähigkeit gewährleistet.

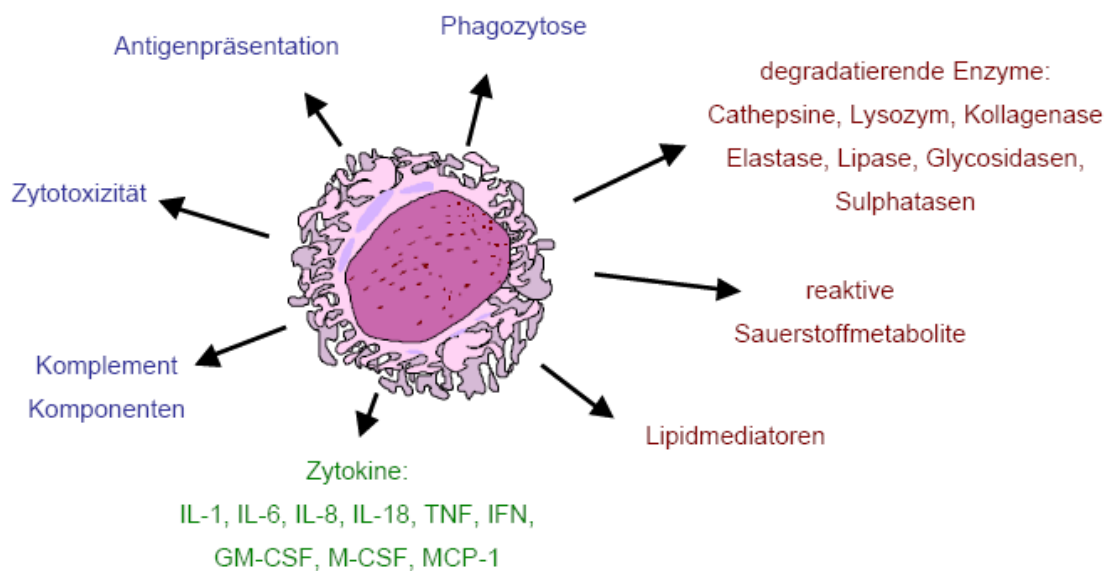
Zu diesem System gehören die Haut und die den Intestinal-, Atem- und Genitaltrakt auskleidenden Schleimhäute mit ihren Sekreten. Sie stellen nicht nur eine physikalische Barriere dar, sondern verhindern aufgrund ihres sauren pH-Wertes und den in ihren Sekreten u.a. enthaltenen Lysozymen die Besiedelung und das Eindringen in den Organismus. Kommt es trotzdem zu einem Eindringen, so erkennt das System hochkonservierte Schlüsselmoleküle auf der Oberfläche von Pathogenen, so genannte PAMPs (pathogen associated molecular patterns), wie z.B. bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), Peptidoglycan, Lipoteichonsäure, Mannane, sowie Glykane mit Hilfe von invariablen Rezeptoren, den pattern recognition Rezeptoren (PRRs) (24). Des Weiteren gehören zum angeborenen Immunsystem molekulare Mechanismen wie das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme, Interferone und Interleukine (IL), sowie zelluläre Komponenten wie die Granulozyten, die natürlichen Killerzellen (die auch beim adaptiven Immunsystem eine Rolle spielen) und die Monozyten bzw. Makrophagen. Auf letztere soll im Folgenden näher eingegangen werden.

### **1.3.1.2. Makrophagen**

Aus pluripotenten Stammzellen des menschlichen Knochenmarks entwickeln sich durch Stimulierung mit verschiedenen Wachstumsfaktoren die unterschiedlichen Blutzellen einschließlich der Monozyten (Hämatopoese). Die Monozyten gelangen nach etwa einem Tag aus dem Knochenmark in die Blutbahn und zirkulieren dort für mehrere Stunden bis Tage. Nach dieser Phase adhären sie an das Endothel der Blutgefäße und können durch Gefäßspalten in das Gewebe einwandern (Diapedese). Im Gewebe wachsen sie und differenzieren in Abhängigkeit vom umgebenen Milieu zu verschiedenen Makrophagentypen (z.B. intestinale Makrophagen, Alveolarmakrophagen, Osteoklasten in den Knochen und Makrophagen im gastrointestinal-assoziierten lymphatischen Gewebe). Die Faktoren des Mikromilieus, die zur Vielfalt der Makrophagentypen bzw. zu einer gewebespezifischen Differenzierung führen, sind weitgehend unbekannt (25). Ausdifferenzierte, gewebespezifische

Makrophagen verbleiben zum Teil mehrere Jahre lang im Gewebe und sind meist nicht mehr replikationsfähig.

Der Begriff Makrophage kommt aus dem griechischem und bedeutet „großer Fresser“, was auf ihre Fähigkeit zur Phagozytose hinweist. Makrophagen sind die größten Phagozyten und besonders effizient und langlebig. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der angeborenen Immunantwort und der Induktion der spezifischen, adaptiven Immunantwort. Kennzeichen dieser Zellen sind neben der Fähigkeit zur Phagozytose, Antigenpräsentation und Zytokinsekretion auch ihr zytotoxisches Potential (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Funktionen und Mediatoren von Makrophagen** (adaptiert nach (26): Aufgeführt sind charakteristische Funktionen von Makrophagen (blau), Mediatoren, die von Makrophagen sezerniert werden (grün) und Mediatoren, die extra- oder intrazellulär degradierend wirken (rot).

Makrophagen sind amöboide Zellen, die das Gewirr extrazellulärer Fasern durchwandern können. Sie haben auf ihrer Oberfläche PRRs, wie beispielsweise den Mannose-Rezeptor, mittels derer sie Schlüsselmoleküle auf Pathogenen erkennen (27;28) und diese dann phagozytieren. Sie sind zudem für die Beseitigung von Überresten abgestorbener Zellen verantwortlich.

Bei der **Phagozytose** schließen Makrophagen körperfremdes Material mit Hilfe von Pseudopodien (Scheinfüßchen) als Phagosomen in die Zelle ein. Die Phagosomen verschmelzen mit Lysosomen zu Phagolysosomen, in denen das körperfremde Material enzymatisch durch Cathepsine, reaktive Sauerstoffmetabolite und Stickoxide in kleinere Fragmente zerlegt wird. Die Phagozytose wird durch so genannte Opsonine, wie Immunglobuline und dem Komplementfaktor C3b, erleichtert. Diese markieren die Oberfläche des körperfremden Materials und werden wiederum von Monozyten und Makrophagen erkannt (25).

Bei der **Antigenpräsentation** werden die zerlegten, körperfremden Fragmente in endosomalen Kompartimenten auf den Histokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex, MHC) Klasse II geladen und anschließend an die Zelloberfläche der Makrophagen transportiert. So präsentierte Antigene werden von T-Zell-Rezeptoren erkannt, was zur Auslösung der spezifischen Immunantwort führt (25).

Die **Zytokinsekretion** und die Freisetzung zahlreicher anderer Substanzen ermöglicht es den Makrophagen, entscheidend in die Immunantwort einzugreifen und andere Komponenten des Immunsystems zu rekrutieren oder deren Funktion zu modulieren. Aktivierte Makrophagen sezernieren u.a. die Zytokine Tumor Nekrose Faktor (TNF), IL-1 $\beta$  und IL-6, aber auch Enzyme, Komplementfaktoren und Wachstumsfaktoren. Sie können hochreaktive Sauerstoffverbindungen (z.B. Wasserstoffperoxid) bilden und sezernieren, sowie chemotaktisch wirkende Signalproteine absondern, die weitere Phagozyten rekrutieren (25).

Die Sekretion von TNF und reaktiven Sauerstoffverbindungen führt zur Lyse der angegriffenen Zellen, weshalb man Makrophagen auch als zytotoxisch bezeichnet (29). Ein anderer Mechanismus der **Zytotoxizität** ist die Antikörper-abhängige Zytotoxizität. Eine auf ihrer Zelloberfläche mit Antikörpern besetzte Zielzelle wird von den Immunglobulinrezeptoren (Fc $\gamma$ -Rezeptoren) der Makrophagen erkannt und anschließend getötet (30).

Da in dieser Arbeit die intestinalen Makrophagen eine große Rolle spielen, sollen ihre Entstehung und Eigenschaften im Folgenden näher beschrieben werden.

### **1.3.1.3. Differenzierung intestinaler Makrophagen**

Intestinale Makrophagen (IMAC) spielen aufgrund ihrer Fähigkeit zur Phagozytose, Zytotoxizität, Antigenpräsentation und der Sekretion von immun- bzw. entzündungsmodulierenden Zytokinen eine wichtige Rolle in der Abwehr von Fremdartigen und Keimen des Darmlumens.

Wie bereits erwähnt, entstehen Makrophagen aus Monozyten, welche in Gewebe eingewandert sind. Die Art der Differenzierung ist dabei abhängig von den anwesenden Faktoren, die spezifisch für das umliegende Mikromilieu sind. Die Differenzierung ist an den Änderungen der Morphologie und der Antigenexpression erkennbar. So sind Makrophagen um ein Vielfaches größer als Monozyten und bilden Pseudopodien aus, die für die Fortbewegung im Gewebe nötig sind und die Phagozytose unterstützen (25). Monozyten exprimieren auf ihrer Zelloberfläche den LPS- Rezeptor (CD14). Dieser wird aufgrund seiner spezifischen Expression auch zur Identifizierung von Monozyten verwendet. Weitere Marker für Monozyten sind der Fcγ III-Rezeptor (CD16), der Rezeptor für die Komplementkomponente C3b (CD11b) und das T-Zell co-stimulierende Molekül B7.2 (CD86). Eine Differenzierung von humanen Blutmonozyten zu Makrophagen ist auch *in vitro* möglich, durch Kultivierung der Zellen für sieben Tage in humanen Serum (31). Jedoch zeigen *in vitro* differenzierte Makrophagen ein deutlich anderes Expressionsmuster der Oberflächenantigene als IMAC (32). Sie exprimieren die für Monozyten typischen Rezeptoren CD14 und CD16. Die Expression von CD16 ist bei ihnen sogar höher als in Monozyten (33). IMAC exprimieren weder den LPS-Rezeptor (CD14), noch den Fcγ III-Rezeptor (CD16) und CD11b ist nur auf weniger als 5% der IMAC nachweisbar (34-37). Des Weiteren exprimieren sie nicht die Toll-like-Rezeptoren 2 und 4, die als PRRs ebenfalls bei der Erkennung von pathogenen Strukturen, wie Lipoproteinen und LPS, eine Rolle spielen (38).

Auch die Effektormoleküle Cathepsin D und NADPH-Oxidase werden von intestinalen Makrophagen nicht exprimiert (39;40).

Diese spezifische Differenzierung, die IMAC während ihrer Reifung vollziehen, geht möglicherweise mit den sehr spezifischen Aufgaben, die sie im intestinalen Immunsystem übernehmen, einher. So entscheidet die Expression der Oberflächenmoleküle CD14 und CD86 z.B. darüber wie reaktionsfähig Makrophagen sein können und in welchem Ausmaß sie eine T-Zell-Antwort induzieren können.

### **1.3.2. Störung des angeborenen Immunsystems als Prädispositionsfaktor**

Aufgrund der Nährstoff- und Umweltbedingungen stellt der Darm ein optimales Milieu für eine große und vielfältige Population von Mikroorganismen dar. Die Aufgabe des intestinalen Epithels besteht in der Verhinderung des Eindringens von Pathogenen aus dem Darmlumen in den Organismus. Gleichzeitig muss es die Aufnahme von Nährstoffen zulassen. Bei der Erfüllung dieser hochselektiven Barrierefunktion spielen neben der Schleimschicht und der Zellmembran auch die Zell-Zell-Kontakte zwischen den Epithelzellen eine wichtige Rolle. Die Art des Kontakts ist dabei abhängig vom Zelltyp.

Schädigungen der Schleimhaut und primäre Störungen der Epithelzellen bzw. der Schleimschicht führen zu einem unphysiologischen Einstrom von Antigenen in die Darmwand und können so eine Entzündung auslösen oder verstärken bei der das intestinale Immunsystem zum Tragen kommt.

Das Darm-assoziierte Immunsystem (gut-associated lymphoid tissue, GALT) ist das größte Immunsystem des menschlichen Körpers. Seine Aufgabe besteht im Erkennen und Auslösen einer effizienten Immunantwort gegenüber krankheitsauslösenden Bakterien und Viren, sowie allergenen Nahrungsbestandteilen. Bei der Erkennung pathogener Bestandteile haben die bereits oben erwähnten PRRs eine große Bedeutung. Das Auslösen der Immunantwort erfolgt dabei z.B. über die bekannten Toll-like-Rezeptoren (41;42), aber auch die Existenz intrazellulärer Mechanismen wird diskutiert (43).



An dieser Stelle sei vor allem die Familie der intrazellulären NOD-Proteine erwähnt. Sie spielen neben den membranständigen Toll-like Rezeptoren eine wichtige Rolle bei der Erkennung von Pathogenen. Wie bereits bei 1.2.1 genannt, gehen Mutationen im NOD2/CARD15 Gen mit einem deutlich erhöhten Risiko für MC einher.

Neben dem Auslösen einer effizienten Immunantwort muss GALT die Überreaktion gegenüber harmlosen Nahrungsbestandteilen und der physiologischen Darmflora unterdrücken, wodurch Schädigungen des körpereigenen Gewebes verhindert werden. Diese Fähigkeit von GALT bezeichnet man als orale Toleranz. Mechanismen für die Vermittlung dieser Toleranz sind Antigen-Eliminierung, veränderte Antigen-Präsentation, Produktion von regulatorischen Zytokinen, Apoptose von aktivierten Immunzellen und die aktive Suppression der Immunantwort. Sie stellen ein Zusammenspiel des angeborenen und des adaptiven Immunsystems dar. Zu den wichtigen zellulären Komponenten von GALT gehören intestinale Makrophagen, sowie die intraepithelialen oder die in der *Lamina propria* gelegenen Lymphozyten, aber auch intestinale Epithelzellen, intestinale Myofibroblasten, intestinale Mastzellen und Endothelzellen spielen eine Rolle. Sie alle sind auf Zell-Zell-Interaktion und –Kommunikation angewiesen, um die Funktionen von GALT auszuüben, weshalb sie verschiedene Interleukine und Zytokine produzieren.

Bei der Regulation von GALT in der gesunden Mukosa existiert ein Gleichgewicht zwischen pro-entzündlichen (z.B. IL-1, IL-6, TNF) (44) und anti-entzündlichen (z.B. IL-10, IL-4) (45) Faktoren. Dieses Gleichgewicht zwischen pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen ist bei CED gestört (46-48). So wurden beispielsweise reduzierte mRNA- und Proteinlevels des anti-inflammatorischen Zytokins IL-4 in Patienten mit CED gefunden (49). Wohingegen erhöhte Konzentrationen der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF in mukosalen Biopsien und Seren von CED-Patienten nachgewiesen wurden (50-56). Auch für das pro-inflammatorische Zytokin INF $\gamma$  wurde eine erhöhte Konzentration in der Mukosa von MC-Patienten gezeigt, jedoch konnte keine Erhöhung im Serum festgestellt werden (57). All diese Beobachtungen

gehen von unterschiedlichen Pathogenese-Theorien bei CED aus, jedoch resultieren letztendlich alle auslösenden Faktoren in einer überschießenden Immunreaktion des intestinalen Immunsystems.

Wie bereits unter 1.3.1.3 erwähnt, kommt es bei der Differenzierung von Makrophagen IMAC zu einem veränderten Expressionsmuster. Sie exprimieren weder den LPS-Rezeptor (CD14), noch die für die Erkennung von PAMPs wichtigen Toll-like-Rezeptoren 2 und 4, auch die Effektormoleküle Cathepsin D und NADPH-Oxidase werden nicht sezerniert. Aufgrund dieses veränderten Expressionsmusters sind sie reaktionsträger und können ihre Aufgabe im intestinalen Immunsystem besser erfüllen. Man hat jedoch in der Mukosa von Patienten mit CED eine vom gesunden Darm abweichende Makrophagenpopulation gefunden. So konnten Doe und Mitarbeiter eine Population von Makrophagen in CED-Patienten mit einer deutlich höheren LPS-Rezeptor (CD14)-Expression nachweisen (34). Des Weiteren konnten Mahida und Mitarbeiter mittels immunhistochemischer Methoden CD16 auf IMAC bei CED nachweisen (35). Die entzündungsassoziierten Makrophagen exprimierten darüber hinaus auch die T-Zell-kostimulatorischen Moleküle B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86), die auf isolierten IMAC aus gesunder Mukosa nicht nachweisbar sind (58). Neben dieser Veränderung der Antigenexpression hat man auch eine Änderung des Aktivierungszustandes der entzündungsassoziierten Makrophagen beobachtet. So sind während einer Entzündung eine erhöhte NADPH-Oxidase-Aktivität, eine vermehrte Cathepsin D-Expression, eine erhöhte Freisetzung von Sauerstoffradikalen und eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen worden (39;40;59), was im Wesentlichen zu lokalen Gewebsschädigungen führt.

### **1.3.3. Faktoren der Mukosaschädigung**

#### **1.3.3.1. Der zentrale pro-entzündliche Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B und seine Regulation**

Transkriptionsfaktoren sind Proteine, die durch sequenzspezifische Bindung an regulatorische Promotor- und Enhancer-Einheiten der DNA die Transkription von Genen regulieren. Es gibt sowohl zellspezifische Transkriptionsfaktoren, Transkriptionsfaktoren, die nur zu einem bestimmten Zeitpunkt aktiv sind, sowie ubiquitäre Transkriptionsfaktoren, die durch Stimuli aktiviert werden. Zu den Letztgenannten gehört NF- $\kappa$ B (nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells), welcher zuerst von Sen und Baltimore 1986, als Transkriptionsfaktor am kappa-Leichtketten-Enhancer, einer spezifischen DNA-Region in reifen B-Lymphozyten bei Mäusen beschrieben wurde (60). Mittlerweile wurde NF- $\kappa$ B jedoch in praktisch allen Geweben und Zelltypen nachgewiesen, wie z.B. in Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Neuronen und Monozyten/Makrophagen, sowie in Viren.

Es handelt sich bei NF- $\kappa$ B um verschiedene Proteine, deren gemeinsames Kennzeichen eine Domäne von etwa 300 Aminosäuren ist, die so genannte Rel-Homologie-Domäne. Jeweils zwei Untereinheiten können in unterschiedlichen Kombinationen aneinander binden und so Homo- oder Heterodimere bilden. Die unterschiedlichen NF- $\kappa$ B-Dimere aktivieren vermutlich verschiedene Zielgene. Aktiviertes NF- $\kappa$ B bindet dazu an ein spezifisches DNA-Motiv von etwa zehn Basenpaaren, das so genannte  $\kappa$ B-Motiv, welches an zahlreichen regulatorischen Bereichen der DNA nachgewiesen wurde, wodurch es zur Initiierung bzw. Verstärkung der Gentranskription kommt.

Zu den Zielgenen des NF- $\kappa$ B-Signalweges zählen unter anderem viele Zytokine, Wachstumsfaktoren und Stress-Proteine (61). NF- $\kappa$ B spielt somit eine Rolle bei der Regulation der Zellproliferation und ist in der Lage durch die Induktion anti-apoptotische Gene die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose zu inhibieren. Seine Aktivierung hat jedoch vor allem Auswirkungen auf Entzündungen, da NF- $\kappa$ B eine Vielzahl pro-inflammatorischer Gene induziert, welche eine Rolle bei der Regulation der angeborenen und adaptiven

Immunantwort spielen (62). So bewirkt die Aktivierung von NF- $\kappa$ B z.B. die Kontrolle der Expression unterschiedlicher Immunmodulatoren (Interleukine wie IL-2, IL-6, IL-8, Chemokine) und ihrer Rezeptoren, wichtiger Enzyme (Cyclooxygenase 2 (COX-2), iNOS, Matrixmetalloproteinase (MMP-9)) und Zelloberflächen-Adhäsionsmoleküle (E-Selektine) (63).

In einigen wenigen Zelltypen ist NF- $\kappa$ B immer im Zellkern vorhanden und somit konstitutiv aktiv, normalerweise liegt es jedoch inaktiv im Zytoplasma vor, bis es durch einen Stimulus aktiviert wird. Stimuli, welche die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auslösen können, reichen von physikalischem Stress (ionisierende Strahlung, UV- Licht), über bakterielle und virale Antigene (z.B. LPS, doppelsträngige RNA), bis hin zu biochemischen Reizen und zellulären Botenstoffen wie Zytokinen, Wachstumsfaktoren oder Hormonen (61). Nach Kontakt der Zelle mit einem NF- $\kappa$ B-aktivierenden Stimulus kommt es zur signalinduzierten Phosphorylierung des spezifischen Inhibitorproteins I $\kappa$ B durch den I $\kappa$ B-Kinase-Komplex (IKK). Dieser Komplex besteht aus drei Untereinheiten, wobei IKK $\alpha$  und IKK $\beta$  Kinase-Aktivität besitzen und die dritte Untereinheit, NEMO (NF- $\kappa$ B essential modulator) für die Phosphorylierung und Aktivierung durch *upstream*-Kinasen notwendig ist (64-66). IKK kann durch Signale von TNF, der Toll-/IL-1-Familie, durch CD3/CD28 Kostimulation von T-Zellen, sowie durch das LMP1-Signal-Protein des Epstein-Barr-Virus aktiviert werden (67) und setzt die Aktivierung von NIK-Kinasen und anderen MAP3-Kinasen voraus (68-72). Der aktivierte IKK phosphoryliert die Untereinheit I $\kappa$ B- $\alpha$  des spezifischen Inhibitorproteins und leitet damit dessen Ubiquitinylierung und den Abbau durch das Proteasom ein (73). Durch die Trennung von NF- $\kappa$ B und I $\kappa$ B kann der Transkriptionsfaktor das Zytoplasma verlassen und in den Zellkern gelangen. NF- $\kappa$ B ist in der Lage sehr schnell auf äußere Einflüsse zu reagieren, so kann man schon wenige Minuten nach Stimulation der Zellen das Inhibitorprotein I $\kappa$ B nicht mehr nachweisen. Erst nach etwa 30 min erscheint I $\kappa$ B erneut (74). Diese *de-novo*-Synthese wird von NF- $\kappa$ B selbst induziert, da die Promotorregion von I $\kappa$ B-Genen ein  $\kappa$ B-Motiv enthält (75;76). Das neusynthetisierte I $\kappa$ B bindet erneut an NF- $\kappa$ B und der Komplex gelangt zurück

ins Zytoplasma, wodurch die Aktivierung beendet ist. Man spricht von einem autoregulatorischen transkriptionellen Rückkopplungsmechanismus (77).

Nach Bindung eines Liganden kommt es zur Rezeptor-Oligomerisation, dies führt über Adaptor-Proteine der TRAF-Familie (TNF-receptor-associated-factor) zur Aktivierung der NIK-IKK-Kaskade (78). Die TRAFs können dabei direkt an cytoplasmatische Domänen des Rezeptors binden (wie z.B. bei CD40, LMP-1 und TNF-Rezeptor 2) oder sie binden über Adaptorproteine, die ihrerseits an bestimmte Domänen des Rezeptors binden können (wie z.B. bei TRADD oder RIP beim TNF-Rezeptor 1). Für die TRAFs 2, 5 und 6 konnte eine Aktivierung von NF- $\kappa$ B nachgewiesen werden (79-82) und alle drei können direkt mit NIK interagieren (82).

TANK (TRAF associated NF- $\kappa$ B activator) ist ein TRAF-bindendes Protein mit sowohl aktivierenden als auch inhibierenden Eigenschaften (83;84). Für die aktivierenden Eigenschaften ist der N-Terminus und eine zentrale Region, mit der TANK an TRAF2 binden kann, erforderlich (83). Da TANK an TRAFs (u.a. TRAF2) binden kann, wurde zunächst angenommen, dass TANK als Konkurrenz-molekül zur TRAF-bindenden cytoplasmatischen Rezeptordomäne fungiert. So könnte TANK in hohen Konzentrationen die Liganden-abhängige Rekrutierung von TRAFs an den Rezeptor verhindern, wodurch die Aktivierung von NIK und damit NF- $\kappa$ B unterbunden würde. Des Weiteren hat der C-Terminus von TANK inhibitorische Eigenschaften, was ebenfalls zu der Annahme führte, dass TANK den TRAF-vermittelten Signalweg inhibiert (83-85). Es war allerdings nicht klar, wie TANK trotz seiner Konkurrenz- und Inhibitoreigenschaften als positiver Kofaktor der TRAFs fungieren konnte, da es in der Lage war bei geringen Konzentrationen von TRAF2 NF- $\kappa$ B zu aktivieren (83).

Durch die Identifizierung von TBK1 (TANK binding kinase 1) konnten diese Widersprüche geklärt werden. In den TNF, IL-1 und CD40-Signalwegen spielt TANK ausschließlich eine inhibitorische Rolle und die beobachtete stimulierende Aktivität, die man ursprünglich TANK zuschrieb, wird von TBK1 vermittelt (86). Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird TBK1 an den schon bestehenden Komplex aus TANK und TRAF2 rekrutiert und es

entsteht ein aktiver tertiärer Komplex, der in die NIK-IKK-Kaskade mündet (Abb. 1.5) (86). Dass TANK und TRAF2 in unstimulierten Zellen assoziiert vorliegen, wurde bereits 1996 von Rothe und Mitarbeitern gezeigt (84). Es ist allerdings noch nicht geklärt, ob TBK1 aus einem bestehenden Depot rekrutiert wird oder neu synthetisiert wird. Nomura und Mitarbeiter beschrieben 2000 eine weitere Möglichkeit der NF- $\kappa$ B-Aktivierung über diesen Komplex. Sie identifizierten IKK-i (*inducible* I $\kappa$ B kinase) und zeigten, dass IKK-i in der Lage ist TANK im TANK/TRAF2-Komplex zu phosphorylieren, wodurch TRAF2 freigesetzt wird und NF- $\kappa$ B aktiviert werden kann (87;88).

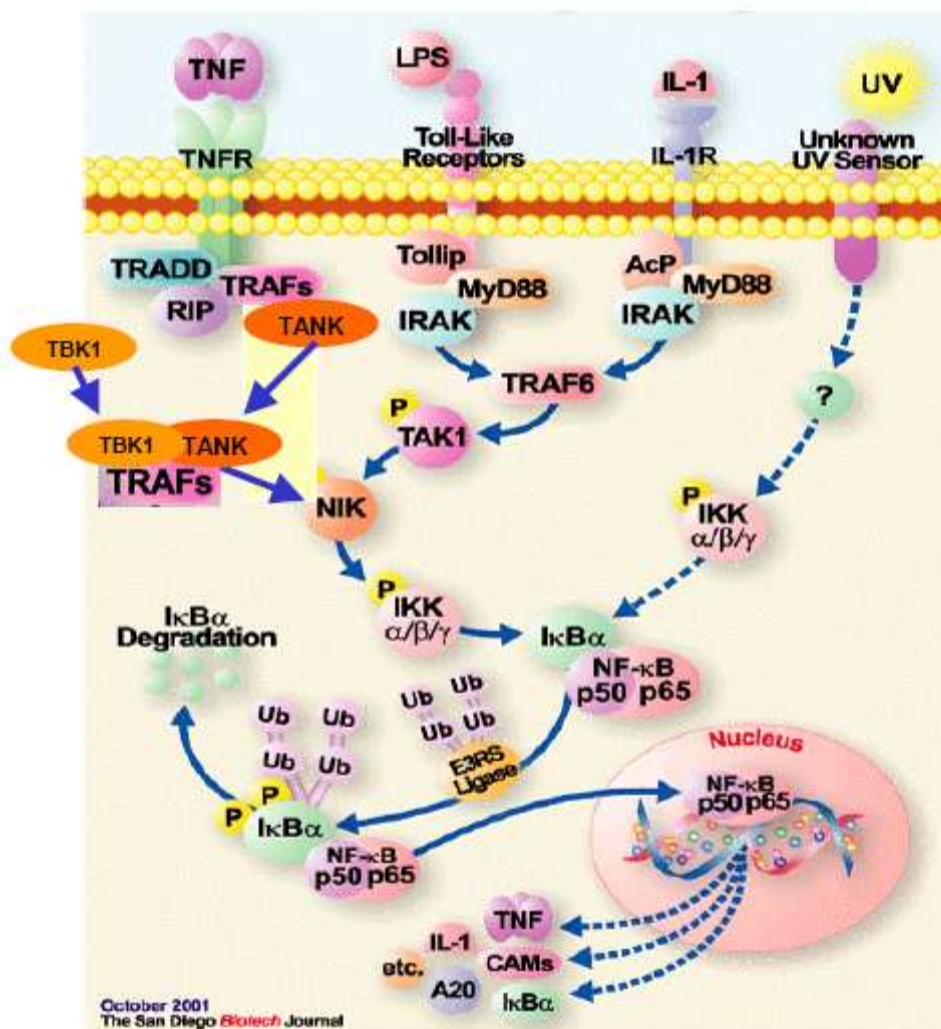


Abb.1.5: NF- $\kappa$ B Signalwege (Quelle: The San Diego Biotech Journal, 2001).

### 1.3.3.2. Mukosaschädigungen durch Proteasen

Proteasen sind intra- und extrazellulär vorkommende Enzyme, die Peptidbindungen spalten können und so für die Proteolyse verantwortlich sind. Dieser Abbau dient zahlreichen intrazellulären Prozessen, wie Koagulation, Verdau, Reifung von Zytokinen und Prohormonen, Apoptose oder der Degradation intrazellulärer Proteine. Nach ihren Angriffspunkten unterscheidet man Endoproteasen, die innerhalb eines Polypeptids spalten, und Exoproteasen, die entweder vom carboxyterminalen (Carboxypeptidasen) oder aminoterminalen (Aminopeptidasen) Ende die Proteinkette angreifen. Die Enzyme „erkennen“ und binden kurze Teilsequenzen des Polypeptids und hydrolysieren relativ spezifisch die Amidbindungen zwischen bestimmten Aminosäuren. Nach ihrem Angriffspunkt im Substratmolekül unterscheidet man Serin-, Cystein-, Aspartat- und Metalloproteasen.

Im Organismus findet ein permanenter Auf-und Abbau von Geweben, Zellen und Organellen statt. Diese Vorgänge laufen kontrolliert ab, wobei ein exzessiver Abbau durch Enzyme beispielsweise durch die Sezernierung der spezifischen Inhibitoren verhindert wird. Jedoch ist dieses Gleichgewicht bei verschiedenen Erkrankungen gestört. Studien aus den letzten Jahren konnten eine erhöhte Konzentration verschiedener Proteasen bei CED-Patienten aufweisen, was zu einer vermehrten Degradation der extrazellulären Matrix, aber auch zur Bildung von Ulzerationen in der Schleimhaut führt. Dass **Metalloproteasen** generell bei der Zerstörung des Darmgewebes eine wichtige Rolle spielen, wiesen Pender und Mitarbeiter bereits 1996 nach (89). Heuschkel und seinen Mitarbeitern gelang es, diesen Einfluss auch auf CED zu übertragen. Sie konnten in Mukosa-Biopsaten von Kindern mit MC und CU eine erhöhte Expression und Sekretion der Metalloprotease Stromelysin-1 nachweisen. Die Konzentration des spezifischen Inhibitors TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteinase*) zeigte dagegen keine Unterschiede zwischen Kontrollen und CED-Patienten (90). Auch die Matrix-Metalloproteinase-3 (MMP-3), welche die Fähigkeit besitzt ein breites Spektrum extrazellulärer Bestandteile abzubauen, wurde in geschädigten Mukosaregionen bei CED-

Patienten nachgewiesen (91;92). Aber auch von anderen Proteasen wie den Cysteinproteinasen (z.B. Cathepsin L) und den Aspartatproteinasen (z.B. Cathepsin D) ist bekannt, dass sie am Verdau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt sind (93-95), weshalb ihr Einfluss bei CED in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus von Forschungsarbeiten tritt.

**Cathepsine** (CTS) sind lysosomale Proteasen, welche Proteine in Lysosomen durch Hydrolyse degradieren. Sie werden im rauen Endoplasmatischen Retikulum als inaktive Vorstufen synthetisiert und über einen Mannose-6-Phosphat-vermittelten Sortierungsprozess in die Lysosomen transportiert. Die Aktivierung der Cathepsine erfolgt bei saurem pH-Wert autokatalytisch durch Abspaltung des Signalmoleküls. Die Anzahl der Lysosomen variiert zwischen den verschiedenen Geweben und Zelltypen, sie ist besonders hoch in Leber, Milz, Nieren und Makrophagen. In dieser Arbeit wurde vor allem der Einfluss der Cathepsine B (CTSB), D (CTSD) und L (CTSL) bei der Colitis untersucht, weshalb im Folgenden näher auf sie eingegangen wird.

**CTSB** und **CTSL** gehören zu den Cysteinproteinasen, welche zunächst nur für den terminalen Abbau bekannt waren. Jedoch wurde durch die Identifizierung weiterer Mitglieder dieser Enzymklasse und Studien an Cathepsin-defizienten Mäusen auch ihre Bedeutung an zahlreichen (patho)physiologischen Prozessen entdeckt. Während CTSB- bzw. CTSL-defiziente Mäuse nur leichte phänotypische Veränderungen zeigen, führte eine simultane Defizienz postnatal innerhalb von 2 bis 4 Wochen aufgrund massiver Atrophien im Gehirn zum Tod der Tiere (96). Die proteolytischen und degradativen Eigenschaften der lysosomalen Cysteinproteasen spielen in zahlreichen degenerativen und chronisch verlaufenden Erkrankungen, wie Krebsmetastasierung, Osteoporose, rheumatoider Arthritis und infektiösen Krankheiten eine große Rolle (97-99). CTSL wird beispielsweise von Tumorzellen sezerniert und ermöglicht durch die Degradation von Membrankomponenten die Tumordinvasion und –metastasierung (95). CTSL ist darüber hinaus in der Lage Kollagenase und Elastase abzubauen, so dass es auch in pathologische Vorgänge bei Arteriosklerose und dem



Lungenemphysem involviert ist (100). CTSB spielt ebenfalls bei verschiedenen Krebserkrankungen eine Rolle. So wurde in Tumoren des Gastrointestinaltraktes, des Ösophagus, der Harnblase, der Prostata, sowie malignen Melanomen eine erhöhte CTSB-Expression nachgewiesen (101-103). Aufgrund dessen wird CTSB seit einigen Jahren als prognostischer Marker für Prostatakarzinome in der Klinik eingesetzt und seine Verwendung bei gastrointestinalen Tumoren und Harnblasenkarzinomen diskutiert.

Bei **CTSD** handelt es sich um eine Aspartatproteinase, die in der Zelle sowohl physiologische als auch degenerative Funktionen erfüllt. Durch die Sekretion des Proteins kann CTSD sowohl intrazellulär wirken als auch extrazellulär, was zu einem Verdau der extrazellulären Matrixproteine führt (93;94). Eine erhöhte Expression von CTSD wurde bei der Wundheilung und Psoriasis, aber auch in zahlreichen Tumoren (kolorektales Karzinom, Magenkarzinom, Brustkrebs) beschrieben, weshalb man CTSD auch als prognostischen Marker bei Brustkrebs verwendet (94;104). Der degradierende Effekt dieser Protease zeigt sich aber auch im Tiermodell. CTSD-defiziente Mäuse sterben bereits ca. 26 Tage nach ihrer Geburt an massiver intestinaler Nekrose, Thromboembolie und Lymphopenie (105). Da man in IMAC von MC-Patienten eine erhöhte Induktion der CTSD-Synthese nachweisen konnte, wohingegen in IMAC von gesunden Kontrollen kein CTSD detektierbar war, wird der Einfluss von CTSD auch bei der Pathogenese von CED diskutiert (40).

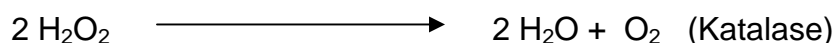
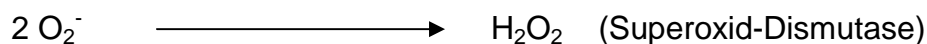
### 1.3.3.3. Gewebeschädigung durch ROS

Bei der Erforschung der Pathogenese von CED wurde in den letzten Jahren die Aufmerksamkeit vermehrt auf reaktive Sauerstoffmetabolite gelenkt. Sauerstoff spielt als essentielles Oxidationsmittel bei vielen biologischen Reaktionen, wie beispielsweise der oxidativen Phosphorylierung in der Atmungskette, eine wichtige Rolle. Jedoch führt die Anwesenheit von Sauerstoff auch zu Problemen, da dieser bei fast allen chemischen Reaktionen auch unerwünschte reaktive Sauerstoffspezien (reactive oxygen species, ROS) entstehen lässt. ROS sind molekulare Sauerstoffderivate, die bereits eine

reaktive Spezies darstellen oder leicht zu solchen konvertieren können. Diese Radikale sind sehr reaktionsfreudig und kurzlebig, da sie aufgrund des einzelnen Elektrons eine starke Tendenz haben, ein zweites Elektron von einem Reaktionspartner zu entziehen, um eine höhere chemische Stabilität zu erreichen.

Je nach Herkunft und Entstehung der ROS unterscheidet man exogene und endogene Quellen. Zu den exogenen Quellen gehören beispielsweise UV-Strahlung, Rauchen, Ernährung, Medikamente und übertriebener Sport. Zu den endogenen Quellen zählen unter anderen enzymatischen Reaktionen wie die der NADPH-Oxidase und der Peroxidase, sowie zelluläre Prozesse wie die Atmungskette und das Abtöten von Bakterien mittels  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch Neutrophile.

Höhere Konzentrationen von ROS in der Zelle, beispielsweise durch hohe UV-Belastung, sind zytotoxisch. Die Zellen sind normalerweise in der Lage mit Hilfe von Enzymen oder kleinen anti-oxidativ wirkenden Molekülen ROS abzubauen und so oxidativen Stress in der Zelle zu verhindern (106). Zu den anti-oxidativ wirkenden Molekülen gehören unter anderen die Ascorbinsäure (Vitamin C), welche ein hohes Redoxpotential hat, die Vitamine A und E, welche Radikale direkt abfangen können und das Glutathion. Zu den beteiligten Enzymen zählen die Superoxid-Dismutase, die Katalase und die Glutathion-Peroxidase. Trifft die Dismutase beispielsweise auf ein Superoxid, so katalysiert sie die Bildung von Wasserstoffperoxid. Dieser ist jedoch selbst sehr reaktiv und kann leicht in Radikale zerfallen, weshalb er entweder durch die Katalase oder mit Hilfe der Glutathion-Peroxidase weiter abgebaut wird. Bei der letzteren Reaktion wird die Energie des Wasserstoffperoxids auf ein schwefelhaltiges Protein (Glutathion, GSH) übertragen, wobei die Thiolgruppen zweier Glutathione zu einer Disulfidverbindung oxidiert werden.



Wie bereits erwähnt, führen hohe Mengen ROS zu oxidativem Stress in der Zelle, da sie Schäden an Zellstrukturen anrichten. Ungesättigte Fettsäuren werden in Anwesenheit von ROS oxidiert. Die Lipidoxidation von Membranlipiden bewirkt eine Senkung des Membranpotentials und einen unkontrollierten Ionenaustausch, was bis zum Zerplatzen der Membran und einer daraus resultierenden Apoptose führen kann. Neben den **Lipidschäden** bewirken ROS auch Änderungen an Proteinen. Am häufigsten sind davon Proteine der mitochondrialen Membran betroffen. Die einzelnen Aminosäuren eines Peptids sind dabei unterschiedlich anfällig für den Angriff der ROS, so sind vor allem Aminosäuren mit Thiolgruppen betroffen, die durch Oxidation Disulfidbrücken mit anderen Thiolgruppen ausbilden. Solche **Proteinschäden** gehen häufig mit Konformationsänderungen einher, die bis zur Deaktivierung der Funktion eines Proteins führen können. In Anwesenheit von ROS kommt es häufig zu Oxidationen von Kofaktoren und einer damit verbundenen **Enzymbeeinträchtigung**. Des Weiteren kann ROS mit Zuckerphosphaten im Rückgrat von DNA/RNA reagieren, was Strangbrüche zur Folge hat. Weitere **DNA-Schäden** richten ROS durch ihre Fähigkeit einzelne Basen in der DNA zu oxidieren (v.a. Guanin und Thymin sind betroffen) an, so dass sich Guanin statt mit Cytosin nun mit Adenin paart. ROS wirken also als intrazelluläre Mutagene.

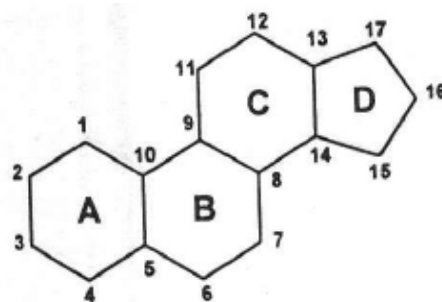
Aufgrund seiner zytotoxischen Eigenschaften wird ROS als Auslöser verschiedener Erkrankungen genannt. Dazu gehören Alzheimer, Myokardinfarkt und Diabetes mellitus. Neuere Studien befassen sich jedoch auch mit dem Einfluss von ROS auf CED. Verschiedene Immunzellen nutzen die zytotoxischen Eigenschaften von ROS, um Bakterien abzutöten. Es konnte gezeigt werden, dass die durch Entzündungen im Darm angelockten Makrophagen und Neutrophilen bei Patienten mit CED deutlich größere Mengen ROS produzieren, als die in Kontroll-Patienten (107). In Kolonmukosabiopsien von CED-Patienten wurde jedoch nicht nur erhöhter oxidativer Stress nachgewiesen, sondern auch eine verminderte anti-oxidative Abwehr (108). So wiesen Mulder und seine Mitarbeiter eine geringere Konzentration von Superoxid-Dismutase in entzündeten Mukosaresektaten von Patienten mit MC und CU nach, verglichen mit nicht entzündeten Bereichen

oder Kontrollen (109). Darüber hinaus gelang es Koch und seinen Mitarbeiter eine deutlich geringere Konzentration an Glutathion in Kolongewebe von CED-Patienten zu detektieren (110). Es konnte gezeigt werden, dass ein Mangel an Glutathion zu ausgedehnten intestinalen Schäden bei Mäusen führt (111). Man geht davon aus, dass der erhöhte oxidative Stress, durch die vermehrte Produktion von ROS, in Kombination mit den verminderten anti-oxidativen Fähigkeiten die Mukosaschäden begünstigen.

## 1.4. Anti-entzündliche Substanzen

### 1.4.1. Steroide als Standard

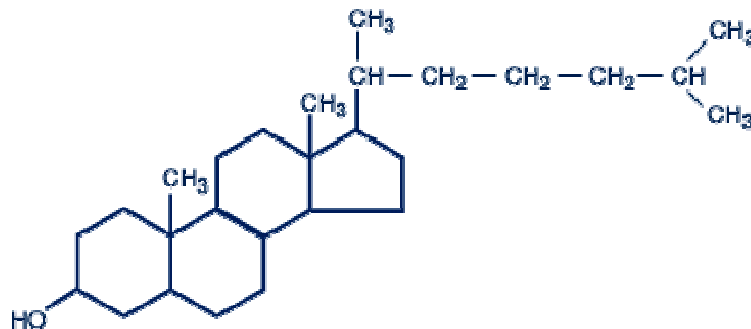
Steroide sind Verbindungen, die alle ein tetrazyklisches Grundgerüst, das Steran, besitzen und der Stoffklasse der Lipide zugeordnet werden (Abb. 1.6). Sie lassen sich nach der Zahl der Doppelbindungen, Art, Zahl und Position funktioneller Gruppen, Anzahl der Methylgruppen, der Alkylseitenkette und der Konfiguration von Bindungen unterscheiden. Sie sind üblicherweise sehr fest (griech. *steros* = fest, starr) und haben in der Regel einen relativ hohen Schmelzpunkt.



**Abb. 1.6:** Strukturformel von Steran.

Natürliche Steroide kommen in Tieren, Pflanzen und Pilzen vor. Ihre chemische Struktur findet man in Vitaminen, Sexualhormonen, Gallensäuren, Krötengiften und Oleander. Im Menschen werden die lipophilen Steroide in der

Leber durch Hydroxylierung und Konjugation mit Glycin wasserlöslich gemacht und als Gallensäuren über die Galle ins Duodenum ausgeschieden. Das wichtigste im menschlichen Organismus vorkommende Steroid ist das Cholesterin (Abb. 1.7), aus welchem Lipoproteine und Steroidhormone aufgebaut werden.



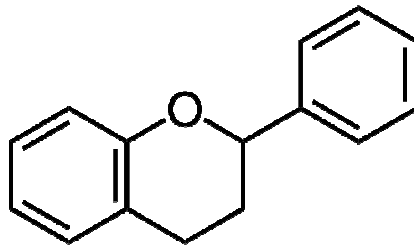
**Abb. 1.7:** Strukturformel von Cholesterin.

Steroide sind in der Lage den pro-entzündlichen Faktor NF-κB zu inhibieren. Es konnte gezeigt werden, dass in Zellkernextrakten aus Kolonbiopsien von entzündeten Mukosa-Abschnitten von CED-Patienten NF-κB deutlich nachweisbar ist im Vergleich zu nicht entzündeten Mukosa-Abschnitten. Nach der Behandlung mit dem Steroid Prednisolon für drei Wochen war NF-κB nicht mehr detektierbar, was mit einer endoskopisch kontrollierten Heilung der Mukosa einherging (112). In Tiermodell-Studien konnte bereits nachgewiesen werden, dass die Inhibierung von NF-κB zur Verbesserung der Colitis führt (113;114). Steroide nehmen daher bei der Behandlung von CED-Patienten eine wichtige Rolle ein. So werden Patienten mit einem akuten Schub je nach Entzündungsaktivität mit topisch oder systemisch wirkenden Steroiden therapiert, um die Entzündung zu beenden und eine Remission zu erreichen. Steroide sind jedoch nicht für den Remissionserhalt geeignet, da sie relevante Langzeitschäden verursachen wie beispielsweise Osteoporose, Diabetes mellitus, starke Gewichtszunahme und Bluthochdruck (115). Für den Remissionserhalt werden Immunsuppressiva

verabreicht und die Steroidbehandlung sofort nach Erreichen der Remission durch Ausschleichen beendet, um Langzeitschäden zu verhindern. Dabei kommt es häufig zu einem erneuten Aufflammen der Entzündung, man spricht von einem steroidabhängigen Verlauf. Hinzu kommt, dass etwa jeder fünfte MC-Patient steroidrefraktär ist (115). Als Alternative werden diese Patienten mit so genannten *Biologicals* therapiert. Der Wirkmechanismus dieser innovativen Therapie beruht auf der Hemmung des pro-inflammatorischen Zytokins TNF, welches eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese von CED, sowie beim Erhalt der Entzündung in der Darmschleimhaut spielt. Die Hemmung wird mittels eines chimären Antikörpers (Infliximab oder Adalimumab) erreicht. Diese Therapie ist bei MC-Patienten sehr effektiv, da die anti-inflammatorische Wirkung früh einsetzt und eine zügige mukosale Heilung eintritt. Bei CU-Patienten ist diese Therapie jedoch nicht abgesichert und ihre Anwendung geht häufig mit heftigen allergischen Reaktionen einher. Darüber hinaus besteht die Gefahr der Malignombildung und diese Art der Therapie ist sehr viel teurer als die Behandlung mit Steroiden (116-118).

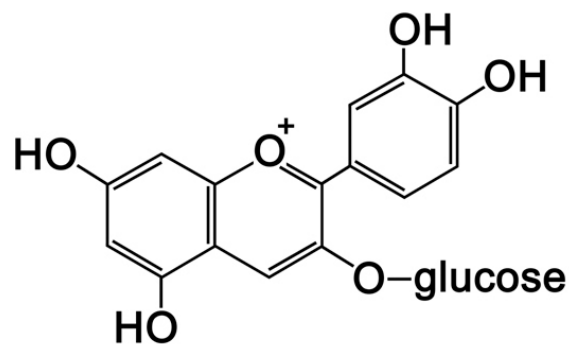
#### **1.4.2. Anthocyane und ihre potentielle Wirkung**

Anthocyane (AC; von griech. anthos = Blüte, *kyaneos* = dunkelblau) sind wasserlösliche Pflanzenfarbstoffe, die zusammen mit anderen Farbstoffen wie beispielsweise den Carotinoiden und Betalainen in nahezu allen höheren Pflanzen (außer den Nelkenartigen und Kakteen) vorkommen und den Blüten und Früchten ihre rote, violette, blaue oder blauschwarze Färbung geben (119). AC gehören zur Stoffgruppe der Flavonoide und lassen sich in die zuckerfreien Anthocyanidine und die Anthocyanine (Glykoside) unterteilen. Sie kommen nur in Landpflanzen vor, da für ihre Biosynthese Produkte der Photosynthese (Photosynthese unter Wasser nicht effizient genug) nötig sind. Das Grundgerüst ist das Flavan (Abb. 1.8) von dem sich alle Anthocyanidine ableiten lassen.



**Abb. 1.8:** Strukturformel von Flavan.

Meist werden diese Anthocyanidine durch eine O-Glykosylierung der Hydroxylgruppe am C-3-Atom zu ihrem entsprechenden Anthocyan umgewandelt. In der Natur kommen vor allem AC mit den Monosacchariden Glucose, Mannose oder Arabinose vor, aber auch Glykosylierungen mit Di- und Trisacchariden sind möglich. Aufgrund der Vielzahl an möglichen Substituenten am Anthocynidin, den verschiedenen Möglichkeiten der Glykosylierungsposition und der unterschiedlichen in Frage kommenden Zucker sind heute mehr als 250 AC bekannt. Die meisten vorkommenden Formen sind Glykoside von Cyanidin (Abb.1.9), Delphinidin, Malvidin, Pelargonidin und Petunidin (120).



**Abb. 1.9:** Strukturformel von Cyanin (Cyanidin-3-glucosid).

AC findet man vor allem in den Zellsaftvakuolen der Epidermiszellen, da sie neben der Aufgabe Tiere anzulocken, um die Bestäubung und Verbreitung sicher zustellen, auch für den UV-Schutz der Pflanzen zuständig sind. Sie sind in der Lage, sowohl ultraviolette Strahlung (270-290nm) als auch Wellenlängen im sichtbaren Bereich (465-560nm) zu absorbieren. Sind Pflanzen starkem UV-Licht oder ionisierender Strahlung ausgesetzt, wird die AC-Produktion durch chemische Botenstoffe angeregt. Ihr Absorptionsbereich richtet sich dabei nach der Molekülstruktur und dem pH-Wert. Dieser entscheidet auch über die Farbe der Blüte, so sind diese bei sauren pH-Werten rot und bei basischen pH-Werten blau-violett (Abb. 1.10). Aufgrund ihrer färbenden Eigenschaften kommen AC auch in der Lebensmittelchemie zum Einsatz. Sie sind unter der Nummer E163 als Lebensmittelfarbstoff zugelassen und werden zum Färben von meist sauren Produkten wie etwa Fruchtgelees, Brausen oder Speiseeis verwendet. Eine weitere wichtige Funktion der AC in Pflanzen ist es oxidativen Stress abzubauen.



**Abb. 1.10: Anthocyane in der Natur.**

In der Natur findet man große Mengen AC beispielsweise in Heidelbeeren, Kirschen, Auberginen und roten Trauben (119). In den letzten Jahren konnten in einer Vielzahl von Studien verschiedene protektive Eigenschaften dieser natürlichen Substanzen, wie etwa anti-oxidative, anti-karzinogene, anti-mikrobielle und anti-entzündliche, nachgewiesen werden. *In*



*vitro* aber auch *in vivo* konnte gezeigt werden, dass sie ROS binden bzw. ihre Bildung verhindern können (121). Diese Fähigkeit ist ihrer phenolischen Struktur zuzuschreiben, die denen der bekannten anti-oxidativ wirkenden Moleküle wie Vitamin A, C und E sehr ähnlich ist. Yan und seine Mitarbeiter konnten sogar zeigen, dass die anti-oxidative Aktivität von Flavonoiden aus Preiselbeeren vergleichbar ist mit der von Vitamin E (122). Die vielen benachbarten Doppelbindungen der AC können freie Radikale binden und die überschüssige Ladung durch viele mögliche Tautomerieformen stabilisieren. In Blut- und Urinproben von Probanden, die täglich einen AC-reichen Saft konsumiert haben, wurde eine Reduktion der oxidativen Zellschädigung festgestellt, was sich in einer verminderten DNA-Schädigung und im Anstieg der Konzentration an reduziertem Glutathion widerspiegelte (123). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass phenolische Substanzen in Rotwein, die kupferkatalysierte Oxidation des *low-density* Lipoproteins (LDL) *in vitro* inhibieren können (124) und auch die Leistung eines durch Ischämie geschädigten Herzens durch den gemäßigten Genuss von Rotwein gesteigert werden kann (125). Diese Beobachtungen, die auf ihre anti-oxidativen Eigenschaften zurückzuführen sind, führen dazu, auch die Fähigkeit der AC das Risiko für Herzerkrankungen zu reduzieren, zu diskutieren. Ein weiterer protektiver Effekt wurde in humanen Leukämiezellen beobachtet, bei denen dosisabhängig durch AC aus einem Hibiskus Apoptose induziert wurde (126). Diese Wirkung konnte auch von einer anderen Arbeitsgruppe bestätigt werden. Für das Überleben von Krebszellen spielt die Proteasomen-Aktivität eine große Rolle. Es stellte sich heraus, dass Flavonoide in der Lage sind, diese zu inhibieren und so Apoptose in humanen Leukämiezellen zu induzieren (127). Auch wirken AC gegen human-pathogene Mikroben. Die Aktivität von *Helicobacter pylori* und *Bacillus cereus* kann durch phenolische Extrakte aus Beeren gehemmt werden (128). Neben diesen anti-oxidativen, anti-karzinogenen und anti-mikrobiellen Eigenschaften wurde gezeigt, dass sie bei der Behandlung der diabetischen Retinopathie hilfreich sind (129), das Sehen im Dunkeln verbessern (130) und vor alters-bedingten Defiziten schützen (131;132).

Für diese Arbeit von besonderem Interesse ist jedoch ihre anti-entzündliche Wirkung. So sind sie in der Lage den CD-40 vermittelten pro-inflammatorischen Signalweg zu unterbrechen (133) und in Monozyten die Sekretion von TNF und IL-8 zu reduzieren (134). Zudem konnte gezeigt werden, dass AC aus schwarzen Sojabohnen die UV-Licht induzierte COX-2 Produktion hemmen (135). Sowohl COX-2 als auch TNF sind Schlüsselmoleküle bei CED.

Neben den AC nahm der Einfluss von Heidelbeeren auf die Colitis einen wichtigen Stellenwert in dieser Dissertation ein. Der Anteil an AC ist in ihnen sehr hoch (ca. 350 mg pro 100g) und im Tierversuch mit Ratten konnte der anti-inflammatorische Effekt getrockneter Heidelbeeren bereits nachgewiesen werden (136). Sie gelten zudem seit jeher als altes Hausmittel gegen Durchfall. Bereits in der frühen Geschichte findet man Eintragungen von deren heilender Wirkung bei Durchfällen wie beispielsweise von einem britischen Arzt aus dem Jahr 1746: „ ... sell us whortle berries, ... Our soldiers eat them for the bloody flux, while encamped at Fort Angus. “ (137). Ihre positive Wirkung bei Durchfall ist wahrscheinlich auf ihren Gerbstoffanteil zurückzuführen. Gerbstoffe sind adstringierend und erzielen das Zusammenziehen der erkrankten Darmschleimhaut (138;139). Anthony und seine Mitarbeiter haben die Wirkung von Heidelbeer-Extrakten an Parasiten untersucht, die weltweit für Diarrhöen verantwortlich sind. *In vitro* konnten sie zeigen, dass der Extrakt zum Absterben bzw. zu morphologischen Veränderung dieser Parasiten führt (140). Interessanterweise berichten auch einige MC-Patienten, dass sie durch die Einnahme von Heidelbeeren die Schubfrequenz minimieren bzw. deren Verlauf abschwächen können. Bei MC-Patienten ist die Mikroflora verrändert (141-143), weshalb auch das antimikrobielle Potential der Heidelbeeren interessant erscheint. Studien der letzten Jahre haben gezeigt, dass Polyphenol-reiche Extrakte aus Heidelbeeren antimikrobiell wirken, in dem sie wahrscheinlich das Adhären der Bakterien verhindern (144;145).

## 1.5. Arbeitsziele

Die Therapiemöglichkeiten von CED-Patienten sind auch heute noch unbefriedigend. Die Patienten werden während eines akuten Schubes mit Steroiden behandelt und die Remission durch Immunsuppressiva aufrechterhalten. Die Anwendung beider Wirkstoffgruppen geht jedoch mit relevanten Nebenwirkungen einher, und auch die Anwendung innovativerer Medikamente wie den *Biologicals* ist nicht unbedenklich. Daher wären neue Therapieoptionen wünschenswert, vor allem bei Langzeitbehandlungen.

Wie bereits erwähnt (1.4.2), berichten Patienten mit MC, dass durch den Verzehr von getrockneten Heidelbeeren die Schubfrequenz vermindert und auch der Verlauf eines Schubes gebessert werden kann. Interessanterweise bestehen Heidelbeeren zu ca. 10% aus AC, deren anti-entzündliche Eigenschaften bereits unter 1.4.2 beschrieben wurden. Das Hauptziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle der AC bei CED und deren möglichen Einsatz bei der Behandlung dieser Patienten zu klären.

1. Welche Signalwege werden durch AC beeinflusst? Dazu wurde eine humane Makrophagenzelllinie in Anwesenheit des AC-Extraktes mit verschiedenen Substanzen stimuliert. Der Aktivierungszustand der Zellen wurde anhand der IL-8 Sekretion geprüft.
2. Parallel zu den *in vitro* Versuchen wurde der Effekt des AC-Extraktes in der experimentellen Colitis untersucht. Dazu wurden verschiedene AC-Konzentrationen sowohl in der akuten als auch der chronischen Dextransodiumsulfat (DSS)- Colitis im Mausmodell getestet. Da MC-Patienten einen positiven Effekt mit gHB beobachtet haben und der hier verwendete AC-Extrakt aus gHB stammt, wurde auch deren Einfluss parallel zu den AC untersucht.

Einen weiteren Ansatz zur Therapie der CED stellen die CTS dar. Diese spielen neben der Proteindegradation im normalen Zellstoffwechsel auch eine große Rolle bei zahlreichen destruktiven und malignen Erkrankungen. In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass die lysosomale Proteinase CTSD in MC-Patienten gegenüber Kontrollen induziert wird (40). Aufgrund dessen wurden in unserer Arbeitsgruppe weitere Cathepsine getestet und ihre Rolle beim massiven Gewebeabbau bei CED-Patienten untersucht. Es wurde sowohl eine generelle Induktion der mRNA von CTSB als auch CTSL in Patienten mit MC und CU festgestellt. Auf Proteinebene wurde jedoch vor allem eine Ansammlung in zerstörten Mukosa-Bereichen nachgewiesen. Eine Inhibition von CTSD bzw. eine simultane Inhibition von CTSB und L in der akuten DSS-Colitis im Mausmodell konnte eine allgemeine Besserung des Colitis-Verlaufs bewirken (146). Ein Ziel dieser Arbeit war es, das effektivste dieser bereits untersuchten Cathepsine für eine mögliche Therapie von CED-Patienten zu identifizieren. Dazu waren folgende Versuchsansätze nötig.

1. Einzelinhibition der zuvor nur simultan inhibierten Cathepsine B und L im Maus-Modell der akuten DSS-Colitis.
2. Einfluss der Cathepsin-Inhibition in der chronischen DSS-Colitis. Dazu wurden zuvor von den zwei effektiveren Cathepsinen der akuten Colitis, Knock-out Mäuse gezüchtet und anschließend in der chronischen DSS-Colitis eingesetzt.

Neben diesen bereits recht praktisch orientierten Projekten, sollte jedoch auch im Sinne der Grundlagenforschung die Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF- $\kappa$ B in intestinalen Makrophagen (IMAC) näher untersucht werden. Dieser liegt in IMAC in gebundener und somit in inaktiver Form im Zytoplasma vor. Somit kommt es auch nicht zur Aktivierung NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene. Dies kann zum einen am Fehlen der Rezeptoren TLR2 und 4 auf IMAC liegen, die nach Binden von LPS oder Peptidoglykan die Aktivierung von NF- $\kappa$ B auslösen

würden, oder aber an TANK. In Vorarbeiten konnte durch subtraktive Hybridisierung eine Induktion von TANK in IMAC gegenüber *in vitro* differenzierten Makrophagen festgestellt werden (39). TANK kann durch Binden an TRAF2 bei gleichzeitiger Abwesenheit von TBK1 die NF- $\kappa$ B-Aktivierung inhibieren. Erste Untersuchungen mittels Affymetrix GeneChip-Analysen in unserer Arbeitsgruppe haben bereits gezeigt, dass TANK in IMAC gegenüber *in vitro* differenzierten Makrophagen etwas höher und TBK1 signifikant geringer exprimiert wird (nicht veröffentlicht).

1. Zunächst wurde cDNA von IMAC von Kontroll- und CED-Patienten und Monozyten gewonnen. Die Expression von TANK und TBK1 wurde anschließend mittels quantitativer PCR (TaqMan<sup>®</sup>) analysiert.
2. Aufgrund des, bereits unter 1.3.1.3 beschriebenen, unterschiedlichen Expressionsmuster sind IMAC reaktionsträger als andere Makrophagen, was für ihre Funktion im intestinalen Immunsystem wichtig ist. Durch Stimulation von IMAC aus Kontroll- und CED-Patienten bzw. Monozyten mit TNF sollte deren unterschiedliche Reaktivität untersucht werden.

## 2. Material

### 2.1. Zellkultur

β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovine Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DNase I	Roche, Mannheim
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN Biotech, Aidenbach
Hanks` Balanced Salt Solution ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$ (HBSS)	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
Hyaluronidase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kollagenase	Sigma-Aldrich, Steinheim
Lymphocytes Separation Medium (LSM)	PAA, Pasching, Österreich
MACS Puffer	<div>PBS pH 7,2 1000 ml</div> <div>BSA 5 g</div> <div>0,5 M EDTA 4 ml</div>
MonoMac6-Medium	<div>RPML-1640</div> <div>FCS 10%</div> <div>NEA 1%</div> <div>OPI Media Supplement 1%</div>
Nicht essentielle Aminosäuren (NEA)	Biochrom, Berlin
OPI Media Supplement	Sigma-Aldrich, Steinheim

Penicillin/Streptomycin (P/S)	PAA, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) ohne $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	PAA, Pasching, Österreich
Phosphat-gepufferte Salzlösung (PBS) mit $\text{Ca}^{2+}$ und $\text{Mg}^{2+}$	Gibco/Invitrogen, Karlsruhe
RPMI-1640 Medium	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypanblau	Biochrom, Berlin

## 2.2. Zytokine

Interferon- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )	Chemicon, Hofheim
Interleukin 1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )	R&D, Minneapolis, MN, USA
Lipopolysaccharid von Salmonella abortus (LPS)	Alexis Biochemicals, Farmingdale, NY, USA
Tumor Nekrose Faktor (TNF)	Tebu Bio, Offenbach

## 2.3. SDS-PAGE und Western Blot

### 2.3.1. RIPA-Lysepuffer

RIPA-Puffer	1M Tris	5 ml
	5M NaCl	3 ml
	Desoxicholsäure	1 g
	Triton X-100	1 ml
	10% SDS	500 $\mu$ l
	Aqua dest.	ad 100 ml
complete proteinase inhibitor mixture	Roche, Mannheim	

### 2.3.2. Proteinbestimmung

BSA	Biomol, Hamburg
Bicinchoninsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Copper (II) Sulfat Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

### 2.3.3. Größenmarker

SeeBlue <sup>®</sup> Plus 2 Prestained Standard	Invitrogen, Karlsruhe
---	-----------------------

### 2.3.4. SDS-PAGE

NuPAGE <sup>®</sup> Gelapparatur	Invitrogen, Karlsruhe														
NuPAGE <sup>®</sup> 4-12% Bis-Tris Gel 1mm x 10 well	Invitrogen, Karlsruhe														
NuPAGE <sup>®</sup> MOPS SDS Running Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe														
Laemmli Ladepuffer	<table> <tr> <td>1,5M Tris-HCl pH 6.8</td><td>2,5 ml</td></tr> <tr> <td>20% SDS</td><td>3 ml</td></tr> <tr> <td>0,5M EDTA</td><td>0,24 ml</td></tr> <tr> <td>Glycerin</td><td>2 ml</td></tr> <tr> <td>Bromphenolblau</td><td>1 Spatelspitze</td></tr> <tr> <td>β-Mercaptoethanol</td><td>0,5%</td></tr> <tr> <td>Aqua dest.</td><td>ad 10 ml</td></tr> </table>	1,5M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml	20% SDS	3 ml	0,5M EDTA	0,24 ml	Glycerin	2 ml	Bromphenolblau	1 Spatelspitze	β-Mercaptoethanol	0,5%	Aqua dest.	ad 10 ml
1,5M Tris-HCl pH 6.8	2,5 ml														
20% SDS	3 ml														
0,5M EDTA	0,24 ml														
Glycerin	2 ml														
Bromphenolblau	1 Spatelspitze														
β-Mercaptoethanol	0,5%														
Aqua dest.	ad 10 ml														



### 2.3.5. Proteintransfer (Blotten)

NuPAGE® Blottingapparatur	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Transferpuffer	Invitrogen, Karlsruhe
NuPAGE® Nitrocellulosemembran	Invitrogen, Karlsruhe
Schwämme	Invitrogen, Karlsruhe
Whatman-Filterpapier	Invitrogen, Karlsruhe

### 2.3.6. Immundetektion

Waschpuffer	5 M NaCl 0,5 M Tris pH 6,8 Tween 20 Aqua dest.	20 ml 20 ml 1 ml ad 1l
Milchpulver	Roth, Karlsruhe	
Blockierlösung	Waschpuffer Milchpulver	100 ml 4 g
ECL Plus Western Blotting Detection System	Amersham Life Science, Braunschweig	
Hyperfilm™ ECL	Amersham Life Science, Braunschweig	
Filmkassette	Olympus, Stuttgart	

### 2.3.7. Stripping

Re-Blot Solution; Antibody Stripping Solution	Chemicon, Hofheim
---	-------------------

## 2.4. Antikörper

Antikörper	Spender	Klon	Hersteller
Actin	Maus		Chemicon International, Temecula, USA
Phospho-ERK 1/2 (Thr202/Tyr204)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
SAPK/JNK	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Phospho-Src (Tyr416)	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Caspase 3	Kaninchen		Cell Signaling Technology, Beverly, USA
Maus CD3	Hamster	145.2c11	Prof. Dr. W. Falk, Universitätsklinikum Regensburg, Regensburg
CD14 MicroBeads	Maus		Miltenyi, Bergisch Gladbach
CD33 MicroBeads	Maus	AC104.3	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Maus IgG-HRP	Ziege		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Kaninchen IgG-HRP	Ziege		Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
Maus IgG <sub>1</sub> -PE	Ziege		Caltag, Hamburg
Goat IgG <sub>1</sub> -PE	Ziege		Caltag, Hamburg
humanes IL-8	Maus		Endogen, Biotechnology, Rockford, IL, USA
humanes IL-8-biotinyliert	Maus		Pierce-Endogen, Biotechnology, Rockford, IL, USA

## 2.5. In vivo Experimente

Balb/c Mäuse weiblich 18-20 g	Janvier, Le Genest St.Isle, Frankreich
C57/B6 Mäuse männlich und weiblich, heterozygot für CTSB für Zucht	AG PD Dr. T. Reinheckel, Uniklinikum Freiburg
C57/B6 und SV129 Mäuse männlich, heterozygot für CTSD für Zucht	AG Prof. Dr. P. Saftig, Universität Kiel
Dextransodiumsulphat (DSS)	MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich
L-trans-Epoxysuccinyl-Ile-Pro-OH propylamid (CA 074)	Bachem, Weil am Rhein

Z-Phe-Tyr-aldehyd	Bachem, Weil am Rhein
Futtermischungen und Pellets	Ssniff Spezialdiäten, Soest

## 2.6. Oligonukleotide

### 2.6.1. Oligonukleotide für Genotypisierung der Cathepsin-Knock-out Mäuse

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma TIB MOLBIOL (Berlin) bezogen.

CTSD Neo Kiel 3	5' GTT GTC ACT GAA GCG GGA AGG GAC TGG CTG 3'
CTSD Neo Kiel 4	5' GCG AAC AGT TCG GCT GGC GCG AGC CCC TGA 3'
CTSD CD53 exon1	5' AGA CTA ACA GGC CTG TTC CC 3'
CTSD CD53 exon2	5' TCA GCT GTA GTT GCT CAC ATG 3'
CTSB MCB-GT1	5' ACA GCC TCA CTC TAC TGA G 3'
CTSB MCB-GT2	5' ACC AGT CTC TTC CAG GAG C 3'
CTSB Neo 756-777	5' CGG AGA ACC TGC GTG CAA TCC 3'

### 2.6.2. Oligonukleotide für Real-Time PCR

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon (Huntsville, AL, USA) bezogen.

β-Actin rev	5' GAT GGA GCC GCC GAT CCA CAC GG 3'
β-Actin for	5' CTA CGT CGC CCT GGA CTT CGA GC 3'
TANK probe	5'- FAM –TCC CTC ACT CGA TTC CCC GGG – TAMRA -3'
TANK for	5' GGA CCC ATC TGA TGC ACC TT 3'
TANK rev	5' TGT GGT CCT CGG ATT GCT TT 3'

TBK1 probe	5'- FAM –TCA CTG GCA GAC GCA TGG GCA – TAMRA -3'
TBK 1 for	5' TCT TCA GGA TAT CGA CAG CAG ATT AT 3'
TBK 1 rev	5'- TCG GAT GAG TGC CTT CTT GAT-3'

## 2.7. Durchflusszytometrie (FACS)

Durchflusszytometer Coulter® EPICS® X-MCL™	Coulter Immunotech, Krefeld
Megafuge 1.0 R	Heraeus Sepatech, Osterode
Polystyrol Röhrchen	Falcon, Becton Dickinson, Heidelberg
Trägerflüssigkeit Isoton®II	Coulter Immunotech, Krefeld

## 2.8. Färbungen

Mayer's Hematoxylin Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim
Eosin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Propidiumiodid-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.9. Fertigkombinationen von Biochemikalien (Kits)

6x Loading Dye	Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada
Endogen® Mouse IFN $\gamma$ -ELISA Kit	Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA
Fluorescin FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit	Calbiochem/Merck, Darmstadt
Gene Checker™ Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Gene Ruler™ 100 bp DNA Ladder Plus	Fermentas International Inc., Burlington, Ontario, Canada

HotStarTaq <sup>®</sup> Master Mix Kit	Qiagen, Hilden
Human GAPDH Mix (20x)	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Human IL-6 ELISA	R&D, Minneapolis, MN, USA
humanes IL-8 (Standard IL-8 ELISA)	R&D, Minneapolis, MN, USA
Luminex mouse Milliplex <sup>™</sup> Map Kit	Millipore, Billerica, MA, USA
Non-Radioactive Cell Proliferation Assay	Promega, Mannheim
QuantiTect Primer Assay Mm_Ctsb_1_SG	Qiagen, Hilden
QuantiTect Primer Assay Mm_Ctsd_1_SG	Qiagen, Hilden
QuantiTect Primer Assay Mm_Ctst_1_SG	Qiagen, Hilden
QuantiTect SYBR-Green PCR Kit	Qiagen, Hilden
QIAshredder <sup>™</sup>	Qiagen, Hilden
Reverse Transcription System	Promega, Mannheim
RNA-later Solution	Ambion-Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
RNase-free Dnase-Kit	Qiagen, Hilden
Rneasy <sup>®</sup> Mini Kit	Qiagen, Hilden
Streptavidin-horseradish Peroxidase	GE Healthcare, Buckinghamshire, UK
Taqman <sup>®</sup> Universal Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Tetramethylbenzidin-Lösung	Sigma-Aldrich, Steinheim

## 2.10. Sonstige Puffer und Lösungen

TBS-Puffer	0,5 M Tris pH 7,6	40 ml
	5 M NaCl	28 ml
	Aqua dest.	ad 1l
50 mM Phosphatpuffer	1M $K_2HPO_4$	13,2 ml
	1M $KH_2PO_4$	86,8 ml
	1:20 verdünnen mit Millipore Wasser	
ELISA-Waschpuffer	1x PBS (pH 7,5)	
	0,05% Triton X-100 (Sigma)	

## 2.11. Geräte

ABI PRISM 7700 Sequence Detection System	Applied Biosystems, Forster City, CA, USA
Analysenwaage, sartorius analytic A120S	Sartorius, Göttingen
Autoklav sanoclav	Wolf, Geislingen
Bandelin Sonopuls HD 70	Bandelin electronic, Berlin
Biofuge 15 Zentrifuge	Heraeus Sepatech, Hanau
Brutschrank Heraeus 6000	Sepatech, Osterode
Durchflusszytometer Coulter <sup>®</sup> EPICS <sup>®</sup> XL-MCL <sup>™</sup>	Coulter Immunotech, Krefeld
Durchlichtmikroskop	E. Leitz, Wetzlar
E-Gel <sup>®</sup> Power Base <sup>™</sup> v.4	Invitrogen, Karlsruhe
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Elektrophoreseapparatur	Gibco BRL Life Technologies, Eggenstein
ELISA Reader	MWG Biotech, Denkendorf

Entwicklermaschine	AGFA, München
Kryostat CM 3050S	Leica, Bensheim
Luminex <sup>®</sup> 100 <sup>™</sup>	Upstate, Charlottesville, VA, USA
Macs <sup>™</sup> Separator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Magnetrührer	Heidolph, Kelheim
Microm HM 400	Richard-Allan Scientific, Kalamazoo, MI, USA
Mikroskop Axiovert 200M	Zeiss, Göttingen
Millipore Wasser-Filtrationsanlage	Millipore, Billerica, MA, USA
NanoPhotometer <sup>™</sup>	IMPLEN, München
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
pH-Meter	wiss. Tech. Werkst., Weilheim
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Pipetten	Gilson,
QIAGEN TissueLyser	Retsch GmbH, Haan
Sterilbank LaminAir <sup>®</sup> HSB 2448	Haraeus Sepatech, Hanau
Thermocycler TRISTAR	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Waage sartorius excellence E1200 S	Sartorius, Göttingen
Wasserbad Lauda	Lauda-Wobser GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen

## 2.12. Sonstige Verbrauchsmaterialien

Deckgläser 24x60 mm	Roth, Karlsruhe
384-Well Platte	Abgene, Epsom, Großbritannien
96-Well Mikrotiterplatte	Corning Incorporated, Corning, NY, USA
1,5 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
0,2 ml PCR Tubes	Biozym hess. Oldendorf
2,0 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
15 ml Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
50 ml Reaktionsgefäße	Falcon, Heidelberg
40 µm Cell Strainer	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
70µm Cell Strainer	BD Biosciences, Bedford, MA, USA
E-Gel <sup>®</sup> Agarose Gel 1,2%	Invitrogen, Karlsruhe
ELISA-Platten Maxisorp	NUNC <sup>™</sup> , Roskilde, Dänemark
Kanülen	Becton-Dickinson, San Josa, USA
MACS LS Separation Columns	Miltenyi, Bergisch Gladbach
MultiSreen <sup>®</sup> HTS 96-Well Filterplatten	Millipore, Billerica, MA, USA
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, IL, USA
Petrischalen	Falcon, Becton-Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
QIAGEN stainless steel Beads ø 5 mm	Qiagen, Hilden
Superfrost Plus <sup>®</sup> Objektträger	Menzel-Gläser, Braunschweig
Spritzen	Becton-Dickinson, San Josa, USA



Stericup Vakuum-Filtereinheit mit Auffanggefäß	Millipore, Billerica, MA, USA
TissueTek®	Sakura Finetek, Zoeterwoude, Niederlande
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	Corning Incorporated, Corning, NY, USA

## 3. Methoden

### 3.1. Zellkultur

#### 3.1.1. Gewinnung und Kultivierung primärer humaner Zellen

In dieser Arbeit wurden differenzierungsspezifische und entzündungsinduzierte Proteine intestinaler Makrophagen identifiziert und funktionell charakterisiert. Voraussetzung für die Durchführung der phänotypischen und funktionellen Untersuchungen war die Isolierung der dazu erforderlichen reinen Zellpopulationen von primären humanen Makrophagen der *Lamina propria* aus Darmresektaten (3.1.1.1) und die Isolation von Monozyten aus Blut (3.1.1.2).

##### 3.1.1.1. Isolierung humaner *Lamina propria* mononukleärer Zellen aus Darmresektaten

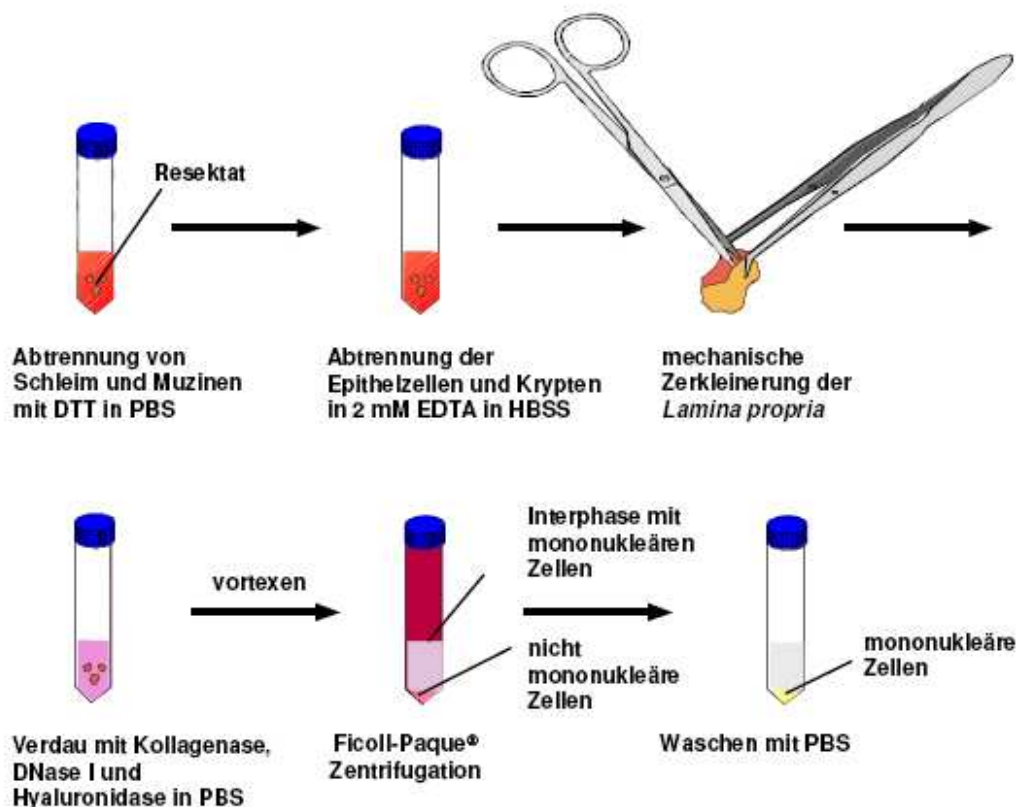
Humane *Lamina propria* mononukleäre Zellen (LPMNZ) wurden aus chirurgischen Darmresektaten nach einem modifizierten Protokoll von Bull gewonnen (147). Die Isolierung der LPMNZ beinhaltet das biochemische Ablösen von Schleim und den Epithelzellen vom Resektat, den enzymatischen Aufschluss der *Lamina propria* und das physikalische Abtrennen der nicht mononukleären Zellen.

Die 4 - 16 cm<sup>2</sup> großen Darmresektate wurden in PBS gespült und von Stuhlresten befreit. Zur Abtrennung von Schleim und Muzinen wurde die *Lamina propria* in 1mM Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich Chemie) in 10 ml PBS für 15 min bei 37°C geschüttelt (Abb. 3.1) und die Rückstände mechanisch mittels einer Schere und durch schütteln entfernt. Zur Abtrennung von Epithelzellen und Krypten wurde die *Lamina propria* in 2mM EDTA in 15 ml Hank's buffered salt solution (HBSS, Gibco) für 20 min bei 37°C stark geschüttelt. Das Resektat wurde anschließend wiederholt in frisches PBS

überführt und die Epithelzellen und Krypten durch kräftiges Schütteln und Vortexen entfernt bis die PBS-Lösung nicht mehr trüb wurde.

Zum enzymatischen Aufschluss wurde die verbleibende *Lamina propria* mechanisch zerkleinert und mit 1 mg/ml Kollagenase Typ I (=336 U/l, Sigma-Aldrich Chemie), 0,3 mg/ml Desoxyribonukleinsäure (DNase I, Roche) und 2mg/ml Hyaluronidase (Sigma-Aldrich) in 30 ml PBS mit  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  unter kräftigem Schütteln für 1h bei 37°C inkubiert. Nach ausgiebigen Vortexen wurden herausgelösten Zellen durch ein Sieb (70µm) abgetrennt und in RPMI-Medium gewaschen.

Mononukleäre Zellen (Makrophagen, Lymphozyten) wurden von nicht mononukleären Zellen (Granulozyten, Erythrozyten, Thrombozyten) mittels des Lymphozyten Separations Medium (LSM, PAA; entspricht Ficoll Paque®) abgetrennt. Hierfür wurde das Zellgemisch in 15 ml gewärmten RPMI-Medium aufgenommen, über 15 ml LSM geschichtet und 20 min bei 700g und 21°C zentrifugiert. Die mononukleären Zellen der Interphase wurden mit PBS gewaschen und die Makrophagen mittels magnetischer Zellsortierung (3.1.1.3) isoliert.



**Abb. 3.1: Isolierung humaner *Lamina propria* mononukleärer Zellen (LPMNZ) (adaptiert nach (26)):**

Darstellung der Isolierung humaner LPMNZ aus Darmresektaten. Nach der Abtrennung von Schleim, Epithelzellen und Krypten, wurde die *Lamina propria* mechanisch zerkleinert und verdaut. Mononukleäre Zellen wurden über Ficoll-Paque®/Lymphozytenseparationsmedium abgetrennt und mit PBS gewaschen.

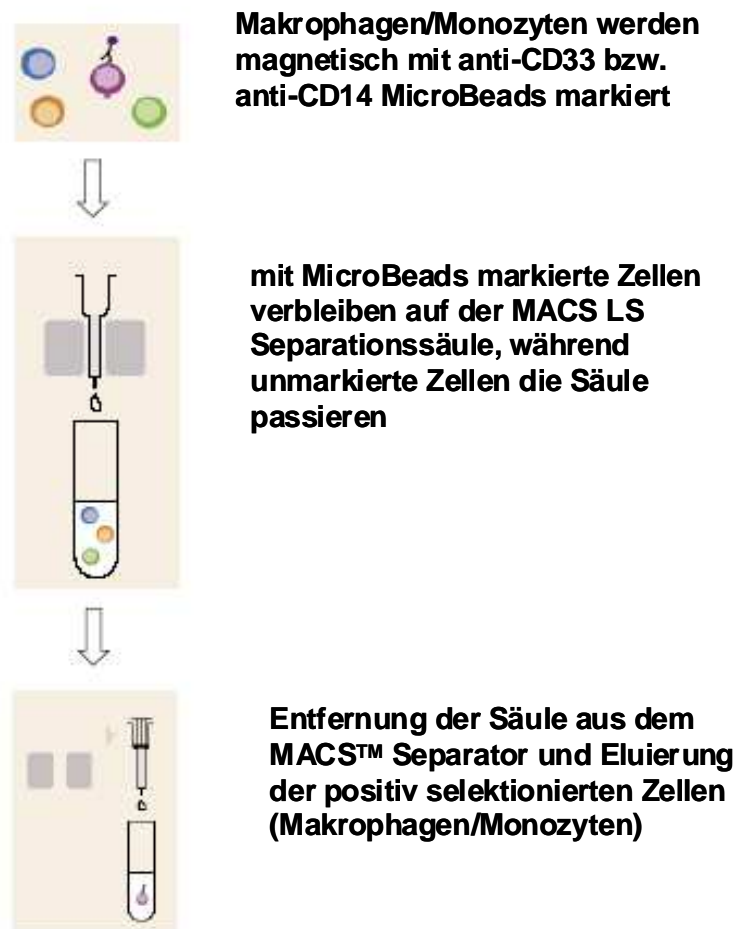
### 3.1.1.2. Isolierung von Monozyten aus Blut

Die Blutentnahme der Spender erfolgte in Lithium-Heparin-Röhrchen. Anschließend wurde das Blut steril mit dem gleichen Volumen gewärmten RPMI-Medium verdünnt. Je 15 ml Blutgemisch wurden auf 15 ml LSM geschichtet und für 20 min bei 700g und 21°C zentrifugiert. Die mononukleären Zellen der Interphase, auch periphere Blutmononukleäre Zellen (PBMNZ) genannt, wurden mit RPMI-Medium gewaschen und die Monozyten mittels magnetischer Zellsortierung (3.1.1.3) isoliert.

### 3.1.1.3. Magnetische Zellsortierung

Die Isolation intestinaler Makrophagen aus LPMNZ erfolgte mittels immunomagnetischer MicroBeads (Miltenyi), die an anti-CD33 Antikörper gekoppelt sind. Die Isolation von Monozyten aus PBMNZ erfolgte mittels immunomagnetischer MicroBeads (Miltenyi), die an anti-CD14 Antikörper gekoppelt sind.

Die LPMNZ bzw. PBMNZ wurden in 1ml MACS Puffer resuspendiert und deren Anzahl bestimmt (3.1.5). Anschließend wurden die LPMNZ/PBMNZ entsprechend dem Protokoll von Miltenyi in MACS Puffer aufgenommen und mit anti-CD33 MicroBeads bzw. anti-CD14 MicroBeads für 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit MACS Puffer gewaschen und in 1 ml aufgenommen. Für die folgende Isolation wurde eine LS Separationssäule (Miltenyi) mit MACS Puffer gespült, mit einer 24 gauge Kanüle versehen und in das magnetische Feld des MACS™ Separator Magneten gebracht (Miltenyi). Die Zellen wurden auf die Säule pipettiert (Abb. 3.2) und anschließend dreimal mit je 500 µl MACS Puffer gewaschen. Die Säule wurde aus dem Magnetfeld entfernt und die CD33 bzw. CD14 positiven Zellen mit 1ml Puffer und mit Hilfe einer Spritze eluiert. Zur Steigerung der Reinheit wurden die Zellen erneut auf eine Separationsäule aufgetragen und der Vorgang wiederholt.



**Abb. 3.2: Magnetische Zellsortierung** (adaptiert nach (148)):

Darstellung der magnetischen Zellsortierung mit Hilfe der MicroBeads (Milteny Biotech, Bergisch Gladbach) in Anlehnung an das Herstellerprotokoll. Mit anti-CD33 bzw. anti-CD14 markierte LPMNZ/PBMNZ werden auf eine LS Separationssäule geladen, im Magnetfeld des MACS™ Separators angereichert und anschließend eluiert.

#### **3.1.1.4. Isolierung mesenterialer Lymphknotenzellen aus der Maus**

Die mesenterialen Lymphknoten wurden den Mäusen entnommen und in 10 ml kaltes RPMI-Medium mit 10% Fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin überführt. Daraufhin wurden die Lymphknoten mit einem 2 ml Spitzenstempel gründlich zerdrückt und die herausgelösten Zellen durch Filtrieren durch ein Sieb (70µm) vom Bindegewebe abgetrennt. Nach dem

Zentrifugieren bei 600g für 15 min bei 4°C wurden die Zellen mit 6 ml Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

Pro Maus wurden 2 Mio Zellen benötigt und erneut gewaschen. Anschließend wurden das Pellet in 2 ml Medium aufgenommen und je 200 µl pro Well in eine 96 Well-Platte ausgesät ( $2 \times 10^5$  Zellen/Well). Die eine Hälfte der Platte wurde bereits ü.N. mit anti-CD3 (AG Prof. W.Falk) gecoatet und unmittelbar vor dem Aussäen mit PBS gewaschen. Die Platte wurde bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach 24h wurden die Überstände abgenommen und bei -20°C gelagert.

### **3.1.2. Zelllinien**

MonoMac6 (MM6) ist eine seit 1988 bestehende nicht adhärente humane Monozytenzelllinie, die aus peripherem Blut eines Patienten mit myeloischer Leukämie etabliert wurde. MM6 Zellen haben phänotypische und funktionelle Eigenschaften von reifen Monozyten (Makrophagen). Sie betreiben Phagozytose und haben typische Oberflächenmarker (149).

### **3.1.3. Gewinnung von Zellüberständen**

Die Überstände von adhärenenten Zellen in der Platte wurden langsam mit einer Pipette abgenommen und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 500g für 5 min zentrifugiert. Erneut wurden die Überstände abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Eventuell beim Abnehmen der Überstände mitgenommene Zellen wurden so als Pellet abgetrennt. Die Überstände wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Zur Gewinnung von Überständen der MonoMac6 Zelllinie wurden die Zellen gründlich resuspendiert, wodurch eventuell leicht adhärenente Zellen sich lösten und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach dem Zentrifugieren bei 500g für 5 min wurden die Überstände aliquotiert und bei -20 °C eingefroren.

Die Überstände von den Lymphknotenzellen wurden langsam abgenommen und in eine weitere 96 Well-Platte überführt. Anschließendes

Zentrifugieren war nicht nötig, da es sich hierbei um stark adhärente Zellen handelt.

### **3.1.4. Gewinnung von Zellextrakten**

#### **3.1.4.1. Zellextrakte für RNA-Gewinnung**

Die Überstände wurden abgenommen (3.1.3) und die Zellen mit 350µl RLT-Puffer (RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit, Qiagen) + 2% β-Mercaptoethanol lysiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit Hilfe einer 20 gauge Kanüle gründlich geschert und bei -80°C eingefroren.

Kolongewebe, aus dem später RNA isoliert werden sollte, wurde in 500µl RNA-Later gegeben, ü.N. bei 4°C stehen gelassen und dann bei -20°C gelagert.

#### **3.1.4.2. Zellextrakte für Proteingewinnung**

Diese Methode wurde nur für die MonoMac6 Zelllinie benötigt. Die Zellen wurden gründlich resuspendiert, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und anschließend bei 500g für 5min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in einem möglichst kleinen Volumen RIPA-Lysepuffer (2.3.1) aufgenommen und für 20 min auf Eis gelassen. Daraufhin wurde die Zellsuspension bei maximaler Geschwindigkeit für 10 min und 4°C zentrifugiert, um die Zellfragmente zu entfernen. Der Überstand mit den Proteinen wurde abgenommen und als Aliquots bei -20°C eingefroren.

### **3.1.5. Zellzahlbestimmung**

Die Zellen wurden in der modifizierten Neubauer-Zählkammer gezählt. Auf einer Glasplatte sind auf einem leicht abgesenkten Mittelstreifen zwei gegenüberliegende quadratische Zählnetze eingraviert. Durch Aufbringen eines Spezial-Deckglases entsteht eine definierte Kammerhöhe von exakt 0,1 mm.



Jedes Zählnetz von 3 mm Seitenlänge und 9 mm<sup>2</sup> Fläche enthält vier Großquadrate mit je 1 mm<sup>2</sup> Fläche. In diesen Großquadraten wurden die Zellen gezählt und die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension nach folgender Formel berechnet:

$$\frac{\text{gezählte Zellen}}{\text{Anzahl der ausgezählten Großquadrate}} * 10^4 = \frac{\text{Zellen}}{\text{ml}}$$

### **3.2. Genotypisierung von Cathepsin Knock-out Mäusen**

Für die Genotypisierung benötigt man DNA. Mittels spezifischer Primer kann man dann in der Polymerasekettenreaktion (PCR) den Genotyp nachweisen. Zur Gewinnung der DNA wurden bereits abgesetzte Mäuse (älter als 4 Wochen) mit Ether betäubt, mit einer Ohrlochzange markiert und anschließend ein ca. 1 cm großes Stück Mausschwanz mit einem Skalpell abgeschnitten, aus dem die DNA isoliert wurde.

#### **3.2.1. DNA-Isolation**

Die Isolation von DNA aus Mausschwanzspitzen erfolgte mit dem QIAamp<sup>®</sup> DNA Mini Kit nach den Angaben des Herstellers.

### 3.2.2. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Für die PCR wurde der HotStarTaq<sup>®</sup> Master Mix Kit von Qiagen verwendet.

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Reaktionsmix	6,25 µl	15 min	95°C
Primer (10 µM)	je 0,5 µl	1 min	95°C
Aqua dest.	ad 12,0 µl	1 min	58°C
DNA	0,5 µl	1 min	72°C
			35x
		10 min	72°C
		∞	4°C

Für die Überprüfung des Genotyps der Cathepsin B (CTSB) Knock-out Mäuse wurde eine Triple-PCR durchgeführt. Es wurden die Primer CTSB MCB-GT1, CTSB MCB-GT2 und CTSB Neo 756-777 in einem Ansatz eingesetzt.

Für die Bestimmung des Cathepsin D (CTSD) Genotyps waren zwei PCR-Ansätze nötig. In der Neo-PCR wurde das Primerpaar CTSD Neo Kiel 3 und CTSD Neo Kiel 4, für die Exon-PCR das Primerpaar CTSD CD53 exon1 und CTSD CD53 exon2 verwendet (2.6.1).

### 3.2.3. Agarose Gelelektrophorese

DNA-Moleküle sind Polyanionen, die an jeder Monomereinheit eine negative Ladung tragen. Verschieden große Nukleinsäuren tragen demnach eine Ladung, die zu der Moleküllänge proportional ist. So können Nukleinsäuren mittels Gelelektrophorese in der Gelmatrix entsprechend ihrer Länge aufgetrennt werden.

In dieser Matrix wandern die Nukleinsäuren nach Anlegen gleicher Spannung im elektrischen Feld zur Anode, wobei die kleineren Fragmente schneller als die größeren Fragmente wandern. Die

Wanderungsgeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus der Fragmentlänge.

Für den Nachweis des PCR-Produktes wurden 1,2% E-Gel<sup>®</sup> Agarose Gele (Invitrogen) verwendet und in eine E-Gel<sup>®</sup> Power Base<sup>™</sup> eingespannt. Nach 5 min Vorlauf wurden die mit 6x Loading Dye gemischten Proben aufgetragen. Als Längenstandard diente der GeneRuler<sup>™</sup> 100 bp DNA Ladder Plus (Fermentas). Nach 30 min waren die Banden weit genug aufgetrennt, um die zu untersuchenden Banden unterscheiden zu können. Zur Sichtbarmachung der DNA-Banden wurde das Agarosegel mit UV-Licht bestrahlt. Etidiumbromid, welches bereits in den Fertiggele enthalten ist, interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA-Moleküle und fluoresziert in kurzwelligem UV-Licht, wodurch die DNA sichtbar wird.

Für die Genotypisierung von CTSB ergibt die Triple-PCR folgende Möglichkeiten:

Wildtyp (+/+)	230 bp
Heterozygot (+/-)	230 bp + 440 bp
Knock-out (-/-)	440 bp

Für die Genotypisierung von CTSD ergeben die Neo-PCR bzw. Exon-PCR folgende Möglichkeiten:

Genotyp	PCR	Bandengröße
Wildtyp (+/+)	Neo-PCR	keine Bande
	Exon-PCR	250 bp
Heterozygot (+/-)	Neo-PCR	280 bp
	Exon-PCR	250 bp

Der homozygote Knock-out von CTSD ist letal. Während der gesamten Zuchtdauer wurden keine Jungen mit diesem Genotyp geboren. Sie wären innerhalb von 26 Tagen verstorben.

### 3.3. Western Blot

Mittels des so genannten Western Blotting ist es möglich, Proteine ihrer Größe nach aufzutrennen und anschließend zu identifizieren. Die Proteine wurden wie unter 3.1.4.2 beschrieben generiert und deren Konzentration bestimmt (3.12.1).

Beim Western Blot wird ein Proteingemisch mittels Sodiumdodecylsulfat - Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) entsprechend des Molekulargewichts seiner Komponenten aufgetrennt. Durch die Anwesenheit von SDS erhalten die Proteine eine negative Ladung. Der Zusatz von  $\beta$ -Mercaptoethanol bewirkt eine Spaltung intramolekularer Disulfidbrücken (Reduktion). Die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine hängt dann nur noch von der Molekülgröße sowie der Porengröße des dreidimensionalen Gel-Netzwerks ab. Nach der elektrophoretischen Auftrennung werden die Proteine auf eine Nitrocellulosemembran transferiert („geblottet“) und können mit spezifischen Antikörpern markiert und mittels einer Chemolumineszenz-Reaktion sichtbar gemacht werden.

#### 3.3.1. SDS-PAGE

Für die Auftrennung der denaturierten Proteine mittels SDS-PAGE wurden 4-12% Bis-Tris-Gele der Firma Invitrogen verwendet und in die Elektrophoresekammer der NuPAGE® Gelapparatur (Invitrogen) eingesetzt. Nach Befüllen der Kammer mit NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (Invitrogen) wurde der Probenkamm entfernt und die Geltaschen mit Laufpuffer gespült.

Zur Vorbereitung der Proben wurden 25-50  $\mu$ g isoliertes Gesamtprotein mit Aqua bidest. auf ein Volumen von maximal 30  $\mu$ l eingestellt und mit 6  $\mu$ l 6x Laemmli-Probenpuffer versetzt. Die äquivalenten Proteinmengen wurden anschließend bei 95°C für 5 min denaturiert und nach kurzer Zentrifugation in die Geltaschen pipettiert. Auf jedes Gel wurde außerdem ein Proteinstandard als Größenmarker für die zu detektierenden Proteine aufgetragen.

Die Spannung betrug 200V und die Stromstärke wurde auf 100mA pro Gel eingestellt. Die Laufzeit richtet sich nach der Molekülgröße, der zu trennenden Proteine.

### **3.3.2. Proteintransfer auf Nitrocellulosemembranen (Blotten)**

Proteine können durch Transfer aus Bis-Tris-Gelen auf geeignete Membranen übertragen werden. Der Proteintransfer erfolgte mittels der NuPAGE® Blottingapparatur. Hierfür wurde eine Sandwich-Anordnung aus Schwämmen, Whatman-Filterpapieren, dem Fertiggel und der Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45 µm) hergestellt. Auf der Kathodenseite des Blotting-Moduls wurden zwei mit Transferpuffer (Invitrogen) getränkte Schwämme gelegt; darauf folgte eine Anordnung aus je einer Lage Whatman-Filterpapier, Fertiggel, Nitrocellulosemembran, Whatman-Filterpapier und zwei weiteren getränkten Schwämmen. Beim Aufbau wurde darauf geachtet, dass sich zwischen den einzelnen Schichten keine Luftblasen befanden, da der Transfer an diesen Stellen eingeschränkt wäre. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 300V und 110mA für eine Stunde.

### **3.3.3. Immundetektion der Proteine**

Zur Immundetektion der Proteine wurde die Nitrocellulosemembran für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT) bzw. ü.N. bei 4°C in Blockierlösung (4% Milchpulver in Waschpuffer) leicht geschüttelt, um freie Bindungsstellen auf der Membran abzusättigen und so unspezifische Bindungen zu reduzieren. Danach wurde die Membran für mindestens eine Stunde bei RT bzw. ü.N. bei 4°C mit dem in Blockierlösung verdünnten Primärantikörper unter leichtem Schütteln inkubiert. Anschließend wurde die Membran für 6x10 min mit Waschpuffer gewaschen und für eine weitere Stunde mit dem gegen den Primärantikörper gerichteten Sekundärantikörper (HRP-gekoppelt; verdünnt in Blockierlösung) inkubiert. Die Membran wurde erneut für 6x10 min gewaschen und mit ECL-

Plus™ Western Blotting Detection Kit entwickelt, in eine Folie gepackt und in eine Filmkassette eingelegt. Es wurde ein Hyperfilm aufgelegt und nach geeigneter Expositionzeit entwickelt.

#### **3.3.4. Strippen der Nitrocellulosemembran**

Nach erfolgter Immundetektion des Zielproteins auf der Nitrocellulosemembran konnte diese für die Detektion weiterer Zielproteine verwendet werden. Hierfür wurden die gebundenen Antikörper durch eine 15-minütige Inkubation in einer Stripping-Lösung (Re-Blot-Solution) bei RT und unter Schütteln entfernt. Anschließend wurde die Membran für 2x10 min gewaschen, neu blockiert und mit dem nächsten Primärantikörper inkubiert.

### **3.4. RNA-Isolation**

Die Gesamt-RNA wurde nach Anleitung des RNeasy® Mini Kits (Qiagen, Hilden) isoliert.

#### **3.4.1. RNA-Isolation aus Zelllysaten**

Die Isolierung von RNA aus Zelllysaten erfolgte nach dem Spin Protokoll. Die Lysate (Herstellung siehe 3.1.4.1) wurden aufgetaut, nochmals mit einer Pipettenspitze homogenisiert und mit 350 µl 70%igem Ethanol versetzt. Das Gemisch wurde auf eine RNeasy Mini Säule gegeben und bei 8000g für 15 s zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Anschließend wurde die Säule einmal mit 700 µl RW1 Puffer und ein zweites Mal mit 350 µl RW1 Puffer gewaschen und jeweils bei 8000g für 15 s zentrifugiert. Pro Probe wurden 10 µl DNase I Stock-Lösung mit 70 µl RDD Puffer gemischt und das Volumen von 80 µl direkt auf die RNeasy Silikat-Gelmembran pipettiert. Der DNase-Verdau fand für 15 min bei RT statt. Anschließend wurde die Säule erneut mit 350 µl

RW1 Puffer und dann mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und jeweils bei 8000g für 15 s zentrifugiert. Nachdem nochmals 500 µl RPE-Puffer auf die Säule gegeben wurden, erfolgte eine zweiminütige Zentrifugation bei 8000g, um die Membran zu trocknen. Die Säule wurde auf ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gesetzt und die RNA mit 30 µl RNase freiem Wasser bei 8000g für eine Minute eluiert.

### 3.4.2. RNA-Isolation aus Kolongewebe

Die Isolierung der RNA aus Kolon-Gewebe erfolgte nach dem *Purification of total RNA from Animal Tissues* Protokoll. Das in RNA-Later gelagerte Gewebe wurde aufgetaut und mit dem Skalpell ein ca. 0,5 cm großes Stück Kolon gewonnen. Dieses wurde in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, welches einen 5 mm großen Stahlbead (Qiagen) enthielt. Daraufhin wurden 600 µl RLT-Puffer (RNeasy® Mini Kit, Qiagen) + 2% β-Mercaptoethanol zugegeben und das Gewebe durch Einspannen des Tubes im QIAGEN TissueLyser für 3 min mit einer Frequenz von 20/s kräftig lysiert. Das Lysat wurde mit dem gleichen Volumen 70%igem Ethanol gemischt, auf eine QIAshredder Säule überführt und anschließend für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert, um verbliebene Gewebereste abzufiltern. Das abzentrifugierte Gemisch wurde auf eine RNeasy Mini Säule überführt und das Protokoll wie bereits unter 3.4.1 beschrieben fortgesetzt.

### 3.5. RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Menge an Gesamt-RNA, die man aus Zellen (Makrophagen, Monozyten) erhalten hat, war stets zu gering, so dass hierbei auf die Konzentrationsbestimmung verzichtet wurde. Für die Umschreibung in cDNA wurden pauschal 26 µl eingesetzt.

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA aus Kolongewebe erhielt man große Mengen an RNA, so dass die Konzentration mit Hilfe des NanoPhotometer™ (IMPLEN) vermessen wurde. Hierfür wurden 1,5 µl RNA aufgetropft und der

0,2 mm Deckel mit der 50er Vergrößerung geschlossen. Das Gerät gibt die RNA-Konzentration in ng/µl an.

### 3.6. Reverse Transkription-PCR (RT-PCR)

Zum Nachweis der RNA Expression wurde die isolierte Gesamt-RNA zunächst in cDNA umgeschrieben. Dies geschah mit dem Reverse Transcription System von Promega. Unter Berücksichtigung der unterschiedlichen RNA-Konzentrationen (3.5) gab es zwei verschiedene Ansätze.

RT-PCR für RNA aus Zelllysaten		RT-PCR für RNA aus Kolongewebe	
RNA	26 µl	RNA	1000 ng
MgCl <sub>2</sub>	10,7 µl	MgCl <sub>2</sub>	4 µl
10xPuffer	5,3 µl	10xPuffer	2 µl
dNTPs (10 mM)	5,3 µl	dNTPs (10 mM)	2 µl
RNase Inhibitor	1,3 µl	RNase Inhibitor	0,5 µl
Oligo (dT <sub>s</sub> )	2,7 µl	Oligo (dT <sub>s</sub> )	1 µl
Reverse Transkriptase (15U)	x µl	Reverse Transkriptase (15U)	x µl
Aqua dest.	ad 53,3 µl	Aqua dest.	ad 20 µl

Die RNA wurde zunächst ohne die anderen Komponenten bei 70°C für zehn Minuten inkubiert, um die Sekundärstrukturen zu denaturieren. Nach Herunterkühlen des Ansatzes wurden die restlichen Komponenten zugegeben und es erfolgte eine 15-minütige Inkubation bei 42°C, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation bei 95°C. Anschließend wurde der Ansatz auf 4°C abgekühlt und das PCR-Tube kurz zentrifugiert.

Die erhaltene cDNA wurde auf ihre Integrität mit Hilfe des Gene Checker™ Kits (Invitrogen) untersucht. Es wurden dabei fünf Komponenten von drei Haushaltsgenen herangezogen: β-Actin 5', β-Actin 3', Clathrin 2K, Clathrin 6K und GAPDH.



PCR-Ansatz		PCR-Programm	
HotStartTaq <sup>®</sup> Master Mix Kit (Qiagen)	10 µl	15 min	95°C
Primer for (5 µM)	2 µl	30 s      95°C 30 s      55°C 1 min      72°C	} 34x
Primer rev (5 µM)	2 µl		
cDNA	1 µl		
Aqua dest.	5 µl	10 min	72°C
		∞	4°C

Der gesamte PCR-Ansatz wurde zur Kontrolle auf ein 1,2%iges Agarosegel aufgetragen und unter UV-Licht ausgewertet. Die Größen der einzelnen Haushaltsgene betrugen:

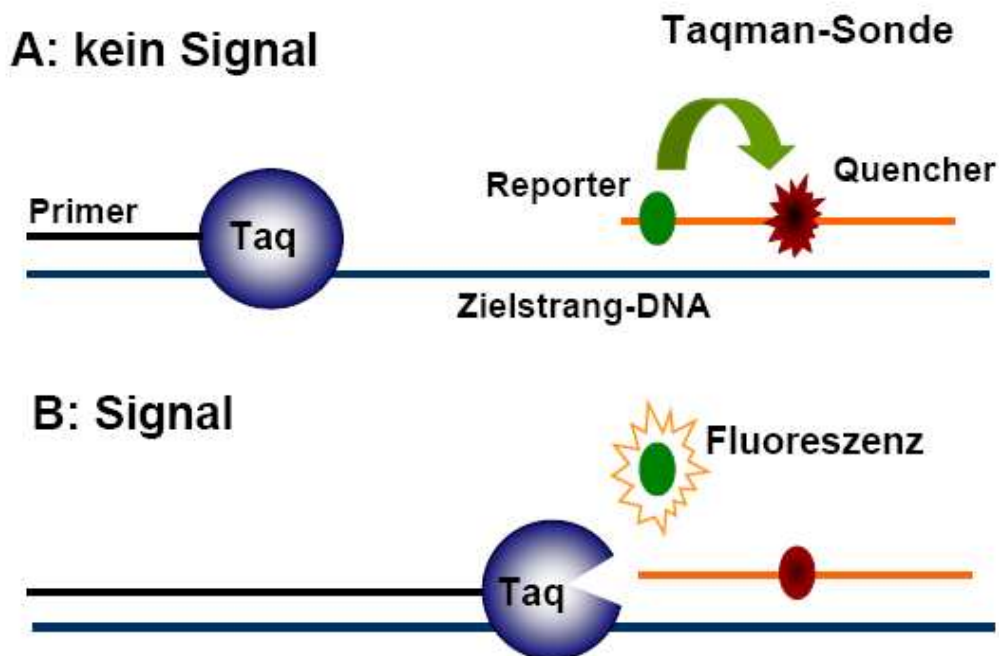
β-Actin 5'	1000 bp
β-Actin 3'	720 bp
Clathrin 2K	550 bp
Clathrin 6K	570 bp
GAPDH	540 bp

### 3.7. Real-Time-PCR mit Taqman<sup>®</sup>

#### 3.7.1. Prinzip

Das Prinzip des Taqman<sup>®</sup> ist Folgendes (Abb. 3.3): Die beiden Primer und die dazwischen liegende Sonde binden spezifisch an die cDNA. Der Farbstoff an der Sonde leuchtet durch die räumliche Nähe zum Quencher nicht. Durch die 5'-Exonukleaseaktivität der Polymerase wird die Sonde abgebaut und der Quencher räumlich vom Reporter getrennt, wodurch er das Fluoreszieren

des Farbstoffes nicht mehr unterdrücken kann. Die Zunahme des freien Farbstoffes wird gemessen und mittels spezieller Software auf die relative Menge der in der Probe vorhandenen cDNA zurückgerechnet.



**Abb. 3.3: Das Taqman<sup>®</sup>-Prinzip** (adaptiert nach (26)):

Durch die 5'-Exonuklease-Aktivität der DNA-Polymerase wird der Quencher räumlich vom Farbstoff getrennt, die Fluoreszenz des Reporters wird messbar und zeigt die Zielstrangsynthese in der PCR an.

### 3.7.2. Durchführung

Die TANK, TBK1 und GAPDH-DNA-Fragmente wurden mittels spezifischer Primer (2.6.2) amplifiziert. Innerhalb der Primer lag der Bindebereich einer genspezifischen Sonde, die an ihrem 5' Ende kovalent an einen Reporter-Farbstoff gebunden war: Für TANK und TBK1 war das 6-FAM, für das Haushaltsgen GAPDH handelte es sich um VIC. Am 3' Ende der Sonde war der Quencher-Farbstoff TAMRA (6-Carboxy-Tetramethyl-Rhodamin) kovalent gebunden. Die Primer wurden mit Hilfe der Primer Express 1.5

Software (PE Applied Biosystems, Forster City, CA, USA) gefunden und durch die Firma MWG Biotech (Ebersberg) synthetisiert. Primer und Sonde für GAPDH sowie der Taqman-Mastermix wurden von der Firma PE Applied Biosystems bezogen.

Eine Reaktion wurde in einem Volumen von 20 µl durchgeführt:

PCR-Ansatz		PCR-Programm	
Taqman-Mastermix	10 µl	2 min	50 °C
Primer for (18 µM)	1 µl	10 min	95 °C
Primer rev (18 µM)	1 µl		
Sonde (5 µM)	1 µl	15 s	95°C
cDNA	1 µl		} 40 x
GAPDH-Mastermix (20x)	1 µl	1 min	60°C
Aqua dest.	5 µl		

Alle Ansätze wurden in Triplikaten in einer 384-Well-Platte (Abgene, Epsom, UK) mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems) gemessen.

### 3.7.3. Datenanalyse

Die während der 40 Zyklen frei werdende Menge des Reporter-Farbstoffes wurde mittels der Sequence Detector Software SDS 2.2 (PE Applied Biosystems) gemessen. Die Fluoreszenz wurde gegen die Zyklenzahl aufgetragen. In der exponentiellen Phase der Kurve wurde eine Gerade (Detektionsschwellenwert) gezogen. Die Zyklenzahl bei der diese Basislinie überschritten wird, nennt man Ct (Cycle threshold)-Wert. Die Ct-Werte von

GAPDH wurden von den Ct-Werten des zu untersuchenden Gens subtrahiert und die drei Ergebnisse des Triplets gemittelt:

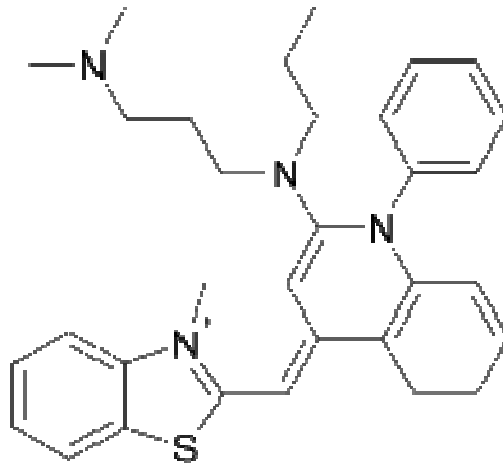
$$dCt = Ct (Gen) - Ct (GAPDH)$$

Der Mittelwert der Kontrollpatienten wurde als 1 definiert. Auf diesen Wert wurden alle zu untersuchenden Proben relativiert. Durch Potenzierung (POTENZ [2;-relativer Wert]) konnte so die relative Startkopienzahl des zu untersuchenden Gens in Bezug auf GAPDH unter Berücksichtigung der exponentiellen Amplifikation verschiedener Patienten verglichen werden.

### **3.8. Real-Time-PCR mit SYBR-Green**

#### **3.8.1. Prinzip**

SYBR-Green I (Abb. 3.4) ist ein interkalierender asymmetrischer Cyanin-Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Der resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei einer Wellenlänge von  $\lambda_{\max} = 494 \text{ nm}$  und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 521 \text{ nm}$ . Bei dieser Form der quantitativen PCR binden zwei Primer spezifisch an die cDNA und die Polymerase amplifiziert die zu untersuchende Sequenz. SYBR-Green bindet an die entstehende doppelsträngige DNA, so dass die Zunahme der Target-DNA mit der Fluoreszenzzunahme korreliert. Auch bei dieser Methode der Real-Time PCR wird die gemessene Zunahme der Fluoreszenz mittels einer speziellen Software auf die relative Menge der in der Probe vorhandenen cDNA zurückgerechnet.



**Abb. 3.4: Strukturformel von SYBR-Green I.**

### 3.8.2. Durchführung und Datenanalyse

Untersucht wurde die Expression von CTSB, CTSD und CTSL. Da bei dieser Methode das gleichzeitige Messen mehrerer Gene nicht möglich ist, wurde das Haushaltsgen  $\beta$ -Actin separat gemessen. Die Primer der verschiedenen Cathepsine wurden von der Firma Qiagen (2.9), die für  $\beta$ -Actin von MWG (2.6.2) bezogen. Eine Reaktion wurde in einem Volumen von 10  $\mu$ l durchgeführt:

PCR-Ansatz für $\beta$ -Actin	
Aqua dest.	0,5 $\mu$ l
Primer for	0,25 $\mu$ l
Primer rev	0,25 $\mu$ l
SYBR Green	5 $\mu$ l
cDNA	4 $\mu$ l

PCR-Ansatz für CTS	
Primer Assay	1 $\mu$ l
SYBR Green	5 $\mu$ l
cDNA	4 $\mu$ l

PCR-Programm			
2 min	50°C		
15 min	95°C		
15 s	95°C	} 45x	
20 s	55 °C		
25 s	72 °C		
1 s	95°C		
15 s	65 °C		
1 s	95 °C		

Alle Ansätze wurden in Triplikaten in einer 384-Well-Platte (Abgene, Epsom, UK) mit dem ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (PE-Applied Biosystems) gemessen.

Die während der 45 Zyklen frei werdende Menge an Fluoreszenz wurde mittels der Sequence Detector Software SDS 2.2 (PE Applied Biosystems) gemessen und ,wie bereits unter 3.7.3 beschrieben, ausgewertet. Die Ct-Werte von  $\beta$ -Actin wurden von den Ct-Werten des zu untersuchenden Gens subtrahiert und die drei Ergebnisse des Triplets gemittelt:

$$dCt = Ct (Gen) - Ct (\beta\text{-Actin})$$

Anschließend wurde der Mittelwert der Kontrollgruppe (dCt (Kontrolle)) von den dCt-Werten aller zu untersuchenden Proben subtrahiert.

$$ddCt = dCt (Probe) - dCt (MW \text{ Kontrolle})$$

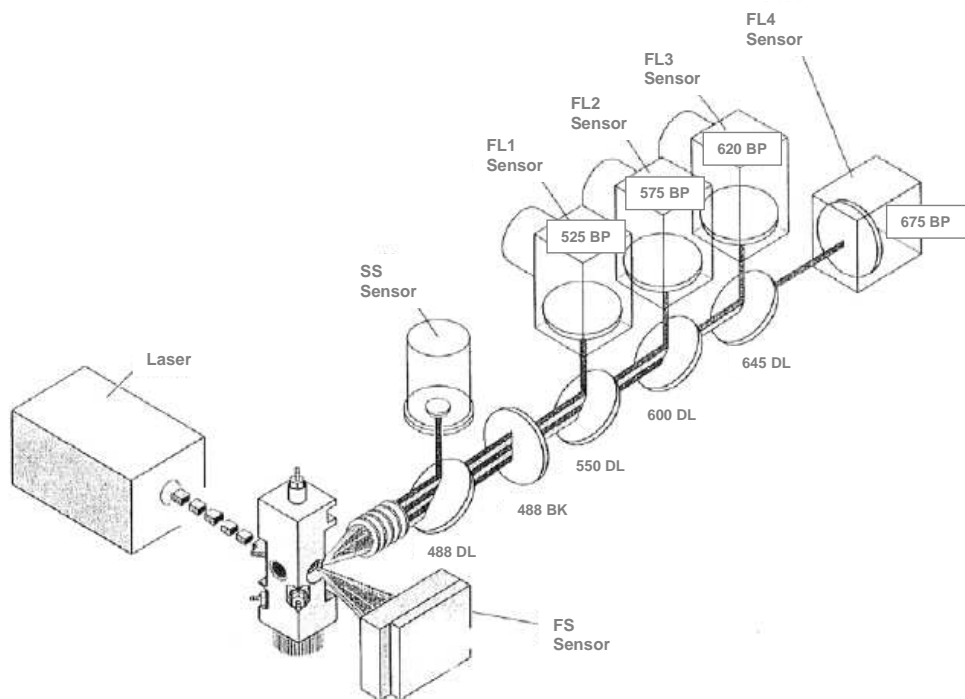
Durch Potenzierung (POTENZ  $[2^{-ddCt}]$ ) konnte so die relative Startkopienzahl des zu untersuchenden Gens in Bezug auf  $\beta$ -Actin in Relation zur Kontrollgruppe verglichen werden.

### 3.9. Durchflussszytometrie

#### 3.9.1. Methode

Die Durchflussszytometrie, auch FACS (Fluorescence activated cell sorting)-Analyse genannt, ermöglicht eine mehrparametrische Analyse von Zellen. Durch Detektion des Streulichtverhaltens und der Fluoreszenz von Einzelzellen, die über spezifische Rezeptoren oder Proteine (membranständig oder intrazellulär) fluoreszenzmarkiert wurden, können chemische und physikalische Eigenschaften der Zellen erfasst werden. Dabei können sehr große Zellzahlen innerhalb kurzer Zeit (bis zu 1000 Zellen/s) analysiert werden.

Beim verwendeten Durchflussszytometer Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup> XL-MCL<sup>™</sup> (Coulter, Immunotech, Krefeld) werden die Zellen in einer Suspension vorgelegt. In einem Flüssigkeitsstrom werden die einzelnen Zellen durch eine Messküvette geschleust, auf die ein Laserstrahl mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm (Argonlaser) trifft. Gestreutes Licht und Fluoreszenz werden über ein System von dichroitischen Spiegeln, optischen Linsen und Filtern zu Photomultipliern (PMT) weitergeleitet und detektiert. Die Abbildung 3.5 zeigt den schematischen Aufbau des optischen Systems des Durchflussszytometers Coulter<sup>®</sup> EPICS<sup>®</sup> XL-MCL<sup>™</sup>.



**Abb. 3.5: Schematische Darstellung des Durchflusszytometers** (adaptiert nach (26)):

Schematische Darstellung des optischen Systems des Durchflusszytometers Coulter® EPICS®XL-MCLTM in Anlehnung an das „user manual“ von Coulter Immunotech (Krefeld). Vorwärtsstreulicht (FS), Seitwärtsstreulicht (SS), dichroitischer Spiegel (DL), Filter (BK) und Sensormessbereich in nm (BP).

Die Photodiode für das Vorwärtsstreulicht (FS) detektiert Licht, das in Strahlenrichtung von der Zelle gestreut wird. Die Intensität des Vorwärtsstreulicht gibt Auskunft über die Größe der Zelle. Das Seitwärtsstreulicht (SS) wird orthogonal zum Strahlengang detektiert. Das SS-Signal ist abhängig von der inneren Struktur der Zelle und liefert ein Maß für die Granularität der Zelle. Die Fluoreszenzemission wird im 90°-Winkel zur Strahlenrichtung des Lasers gesammelt und nach Abtrennung mittels dichroitischen Spiegeln und Interferenzfiltern in Spektralbereiche bestimmter Wellenlängen aufgetrennt:



Fluoreszenz 1 (FL1): 505-545 nm, mit 525 nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 2 (FL2): 555-600 nm, mit 575 nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 3 (FL3): 605-645 nm, mit 620 nm Bandpassfilter

Fluoreszenz 4 (FL4): 650-725 nm, mit 675 nm Bandpassfilter

Sämtliche Auswertungen der Messungen wurden mit der Software Win.MDI-2.6 (J.Trotter) durchgeführt.

### **3.9.2. Makrophagenreinheit**

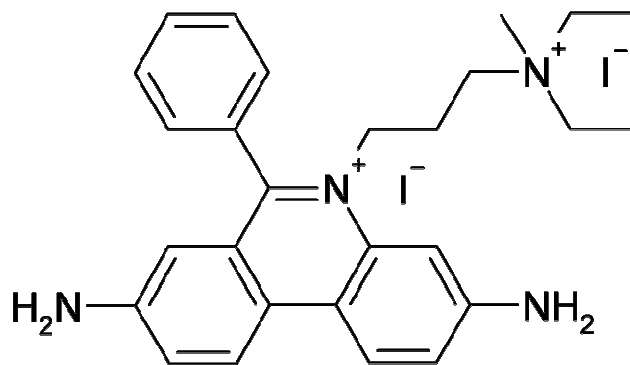
In dieser Arbeit erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der magnetisch isolierten Makrophagen, um deren Reinheit zu bestimmen. Zunächst erfolgte ein Blockierschritt mit Ziegenerum (1:500 verdünnt) für 30 min auf Eis. Die Makrophagen wurden anschließend auf zwei 1,5 ml Reaktionsgefäße aufgeteilt. Die Markierung der Zellen erfolgte durch eine 15-minütige Inkubation auf Eis mit einem Antikörper, der gegen den CD33-MicroBead Antikörper gerichtet war (Ziege anti-Maus IgG<sub>1</sub>-PE, Caltag). Die Inkubation von Makrophagen mit dem Isotyp-Antikörper Ziege IgG<sub>1</sub>-PE (Caltag) diente dem Ausschluss unspezifischer Färbereaktionen. Nach zweimaligem Waschen wurden die Zellen in PBS resuspendiert und gemessen.

### **3.9.3. Apoptosenachweis**

Die Analyse apoptotischer Zellen erfolgte am Durchflusszytometer durch Detektion fragmentierter genomischer DNA, welche anhand des so genannten prä-G1-Peaks zu erkennen ist. Die DNA muss für dieses Verfahren zunächst mit Propidiumiodid gefärbt werden.

### 3.9.3.1. DNA-Färbung mit Propidiumiodid

Zur Markierung der DNA wurde der Fluoreszenzfarbstoff Propidiumiodid (PI) verwendet. Das Absorptionsmaximum von PI liegt bei 536 nm, das Emissionsmaximum bei 617 nm. In dieser Arbeit wurde die PI-Fluoreszenz immer im FL3-Kanal detektiert. PI ist ein polares Fluorochrom (Abb.3.6), welches durch die vorher mit 70%igem Methanol permeabilisierte Membran in die Zelle eindringt und stöchiometrisch zwischen die Basen der doppelsträngigen Nukleinsäuren interkaliert. Die resultierende Fluoreszenz ist proportional zum DNA-Gehalt und kann somit zur DNA-Quantifizierung und zur Zellzyklusanalyse verwendet werden.



**Abb. 3.6: Strukturformel von Propidiumiodid.**

Für die PI-Färbung wurden die Zellen zunächst mit kaltem PBS gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 300 µl kaltem PBS resuspendiert. Anschließend wurden 700µl eisgekühltes 70%iges Methanol zugetropft. Nach leichtem Vortexen erfolgte die Permeabilisierung der Zellmembran bei gleichzeitiger Fixierung der Zellen bei -20°C über Nacht. Nach zwei Waschschritten mit kaltem PBS wurde das Zellpellet in 485 µl PBS resuspendiert, mit 5 µl RNaseA (1 mg/ml) versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt zerstört doppelsträngige RNA, in die das

Propidiumiodid sonst ebenfalls interkalieren würde. Im Anschluss wurden die Zellen mit 25 µl PI (1mg/ml) unter Lichtausschluss für 5 min auf Eis inkubiert und direkt vor der Messung 10mal durch eine Kanüle gezogen, um die Zellen zu vereinzeln. Für die Auswertung wurden in das erhaltene DNA-Histogramm stellvertretend für die G1-, S- und G2/M-Populationen drei Fit-Funktionen eingepasst. Die Fläche unter den Kurven wurde integriert und die prozentualen Anteile der Phasen des Zellzyklus berechnet.

### **3.9.3.2. Zell-Zyklus-Analyse und Apoptose-Nachweis**

Proliferierende Zellen durchlaufen nacheinander folgende Stadien des Zellzyklus: G1(gap1, Ruhephase), S (synthesis, DNA-Synthese) und G2/M (gap2/mitosis, Mitose), worauf wieder G1 folgt. Wenn man Zellen über einen Zyklus hinweg verfolgt, besitzen sie in G1 den einfachen DNA-Gehalt, im Verlauf der S-Phase wird dieser verdoppelt, in G2/M liegt der doppelte DNA-Gehalt vor und bei der anschließenden Zellteilung halbiert er sich wieder auf den einfachen Gehalt. Durch Propidiumiodid lässt sich der DNA-Gehalt einer Zelle durchflusszytometrisch analysieren und sich somit ihre Position im Zellzyklus feststellen. Die Anzahl apoptotischer Zellen entspricht dem Integral unter dem prä-G1-Peak.

## **3.10. Stoffwechselaktivitätstest**

Um die eventuelle Zytotoxizität des Anthocyanextraktes auf die MM6-Zelllinie zu untersuchen, wurden je 50.000 MM6-Zellen pro 96-Well in 100µl MM6-Medium ohne FCS ü.N. ausgesät. Am nächsten Tag wurden je 50µl des Extraktes bzw. Mediums zupipettiert und die Gabe nach 3h wiederholt. Nach einer weiteren ü.N.-Inkubation wurden die Zellen mit je 20µl Tetrazoliumlösung/Well versetzt. Zur Herstellung der Lösung wurden 1ml 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl) -5- (3-Carboxymethoxyphenyl) -2H-Tetrazoliumsalz (MTS) mit 50µl Phenazin-methosulfat (PMS) vermischt. Nach 4h wurde die Extinktion bei 490 und 650 nm gemessen. Lebende Zellen setzen mit Hilfe von

Dehydrogenasen das gelbe Tetrazoliumsalz zu einem rötlichen Formazan-Produkt um. Die Konzentration des Formazan-Produktes ist direkt proportional zur Stoffwechselaktivität und damit Vitalität der Zellen.

### **3.11. Färbemethoden**

#### **3.11.1. Hämatoxylin-Eosin-Färbung**

Zur histologischen und pathologischen Beurteilung des in dieser Arbeit verwendeten und in Paraffin-eingebettetem Kolongewebes wurden 2 µm dicke Schnitte angefertigt und das Paraffin durch anschließendes Abschmelzen im Brutschrank bei 100°C für eine Stunde und zweimaliges Inkubieren für 10 min im Xylol entfernt. Daraufhin wurden die Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe (2x 100%, 1x 90% und 1x 70% Ethanol) rehydriert, für 9 min mit Hämatoxylin gefärbt und anschließend gebläut (dreiminütiges Entfärben mit warmem Wasser, gefolgt von dreiminütigen Entfärben mit kaltem Wasser). Danach wurden die Schnitte für 30 s mit Eosin gefärbt, kurz mit Wasser gespült und durch eine aufsteigende Ethanolreihe dehydriert, gefolgt von einer zweimaligen Inkubation für 10 min mit Xylol. Zum Schluss wurden die Schnitte mit Entellan<sup>®</sup> (Merck) eingedeckt.

#### **3.11.2. DNA-Färbung mit Propidiumiodid**

Die Methode der DNA-Färbung mit Propidiumiodid wurde bereits unter Punkt 3.9.3.1 beschrieben.

#### **3.11.3. TUNEL-Assay**

Zum Nachweis toter Zellen in murinen Kolongewebe wurde der Fluorescein FragEL<sup>™</sup> DNA Fragmentation Detection Kit von Calbiochem verwendet.

Als Material diente das in Paraffin eingebettete Kolongewebe, von welchem 2 µm dicke Schnitte angefertigt wurden. Das Paraffin wurde durch zweimaliges Inkubieren für fünf Minuten in frischem Xylol entfernt und die Schnitte durch eine absteigende Ethanolreihe (2x 5 min in 100%, 1x 3min in 90%, 1x 3 min in 80% und 1x 3 min in 70% Ethanol) rehydriert. Die Schnitte wurde anschließend kurz in TBS-Puffer gewaschen, die Objektträger getrocknet und in eine feuchte Kammer gelegt. Um die DNA färben zu können, mussten die Schnitte mit Proteinase K permeabilisiert werden. Dazu wurden 100 µl der Enzymlösung (Endkonzentration 20 µg/ml) direkt auf die Probe pipettiert und für 20 min bei RT inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Objektträger erneut mit TBS gewaschen. Zur Generierung einer Positiv-Kontrolle wurde eine Probe mit DNase I (Endkonzentration 1µg/ml in TBS/ 1 mM MgSO<sub>4</sub>) für 20 min inkubiert und kurz mit TBS gewaschen. Alle Schnitte wurden anschließend mit 100 µl Terminal Deoxynukleotidyl Transferase (TdT) – Äquilibriumspuffer für 20 min behandelt. Für jede Probe wurden dann 57 µl Fluorescin FragEL™ TdT Labeling Reaction Mix mit 3 µl TdT-Enzym gemischt, direkt auf den Schnitt gegeben und mit Parafilm bedeckt. Zur Generierung einer Negativ-Kontrolle wurde ein Schnitt nur mit Labeling Reaction Mix ohne das Enzym TdT behandelt. Die Objektträger wurden für 1h in einer Entwicklerbox mit feuchten Tüchern bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Parafilm entfernt, die Schnitte zweimal für 1 min in TBS-Puffer gewaschen und trocken gewischt. Zum Schluss wurde ein Deckglas mit Fluorescin-FragEL™ Mounting Medium aufgebracht, überschüssiges Medium entfernt und das Deckglas mit Nagellack abgedichtet. Die Schnitte wurden im Dunkeln bei 4°C für maximal vier Tage gelagert.

Die Auswertung erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Gesamte Zellen wurden durch einen DAPI-Filter (330-380 nm), die fragmentierte DNA durch einen Standard Fluorescin-Filter (465-495 nm) sichtbar.

### 3.12. Quantitative Messung von Proteinen

#### 3.12.1. Bestimmung der Proteinkonzentration (BCA-Test)

Der BCA (bicinchoninic acid)-Test ist eine Methode zur photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration. In wässriger alkalischer Lösung wird  $\text{Cu}^{2+}$  durch Protein zu  $\text{Cu}^{1+}$  reduziert, welches einen farbigen Komplex mit jeweils zwei Molekülen BCA bildet.

Hierfür wurden 10  $\mu\text{l}$  Gesamtproteinlösung mit 200  $\mu\text{l}$  BCA :  $\text{Cu}^{2+}$  (50:1) Mischung für 30 min bei 37°C inkubiert. Entstandene Farbkomplexe wurden anschließend mit einem Absorptionsspektrometer (ELISA-Reader, Emax) bei einer Wellenlänge von 562 nm vermessen.

Absolute Werte für den Proteingehalt wurden durch die Messung einer Verdünnungsreihe einer Rinderserumalbumin (BSA) -Standardlösung erstellt. Durch Auftragung der Absorption gegen den Proteingehalt der Standardverdünnungsreihe erhielt man eine Eichgerade, mittels der der Gesamtproteingehalt der Proben ermittelt werden konnte (Programm SOFTmax PRO von Molecular Devices, USA).

#### 3.12.2. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

Mittels ELISA wurde die Sekretion von humanem IL-6 (R&D) und murinen IFN $\gamma$  (Pierce) von Zellüberständen bestimmt. Die Durchführung der Assays erfolgte nach den entsprechenden Protokollen der Hersteller.

Des Weiteren wurde die Sekretion von humanem IL-8 in MM6-Zelllinien untersucht. Zunächst wurden die ELISA-Platten mit 100 $\mu\text{l}$ / Well humanem IL-8 Antikörper (Endogen) ü.N. bei 4°C gecoatet. Der Antikörper wurde in einer Konzentration von 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$  in 0,1M  $\text{NaHCO}_3$  -Puffer (pH 8,5) verdünnt. Die Platten wurden dreimal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen und anschließend mit 200 $\mu\text{l}$  einer PBS/10% FCS-Lösung für 30 min blockiert. Nach erneutem Waschen wurden 100 $\mu\text{l}$  Standard bzw. Probe pipettiert und für 1h bei RT inkubiert. Die Platten wurden wieder gewaschen und mit 100 $\mu\text{l}$  biotinylierter IL-8

Antikörper-Lösung (Pierce-Endogen; 100ng/ml in PBS/10%FCS gelöst) für 1h bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurden 100µl/Well einer Streptavidin-Peroxidase-Lösung (HE-Healthcare; Verdünnung 1:2000 in PBS/10% FCS) zupipettiert. Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde ein letztes Mal gewaschen und je 100µl/Well Tetramethylbenzidin-Lösung (Sigma-Aldrich) zupipettiert. Nach 30 min Inkubation wurde die Reaktion mit 50µl 0,5M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> -Lösung gestoppt und die Extinktion bei 450/540nm gemessen.

### 3.12.3. Luminex®

Die Zytokine IL-6, IL-10, IL-13, IL-17 und TNF wurden mittels der Luminex®-Technologie in Zellüberständen von murinen Lymphknotenzellen ermittelt. Dazu wurde der Luminex mouse Milliplex™ Map Kit der Firma Millipore verwendet.

Zunächst wurde jedes Well der 96-Well-Filterplatte mit je 10 µl *Assay-Buffer* angefeuchtet und dann jeweils 50 µl der Standardverdünnungen bzw. 50 µl der Probe in die Vertiefungen pipettiert. Dazu wurden je 25 µl der *Beadsolution* gegeben und die Platte ü.N. bei 4°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Der Inhalt der Wells wurde mittels einer Vakuumpumpe durch den Filter am Plattenboden abgesaugt und jedes Well zweimal mit je 200 µl Waschpuffer gespült. Anschließend wurden je 25 µl Reporter-Solution zugegeben und die Platte unter leichtem Schütteln bei RT inkubiert. Nach einer Stunde wurden jeweils 25 µl Streptavidin-Phycoerythrin-Solution zupipettiert und die Proben nochmals für 30 min inkubiert. Daraufhin wurde die Platte erneut abgesaugt und zweimal mit je 200 µl Waschpuffer gewaschen. In jedes Well wurden 150 µl *Sheath Fluid* pipettiert und nach kurzem Aufschütteln die Proben im Luminex® 100™ vermessen.

### 3.12.4. Western Blot

Der Western Blot stellt ebenfalls eine Methode zur Proteinbestimmung dar und wurde bereits ausführlich unter 3.3 beschrieben.

## 3.13. Experimentelle Colitis im Tiermodell

### 3.13.1. Tiermodell

Für die Tierversuche zur Testung der getrockneten Heidelbeeren (gHB) bzw. des Anthocyanextraktes und in der akuten Colitis des Cathepsinprojektes wurden 4-6 Wochen alte weibliche Balb/c-Mäuse (Janvier) mit einem Ausgangsgewicht von ca. 20 g verwendet. Die Tiere hatten Futter und Wasser *ad libitum*. Die Studien wurden durch die lokale Ethikkommission genehmigt.

Um die Auswirkungen des CTSB- bzw. CTSD- Knock-outs in der chronischen Colitis zu untersuchen, wurden C57/B6 Mäuse mit diesen Genotypen gezüchtet. Die Ausgangstiere für diese Zuchten wurden von den Arbeitsgruppen von PD Dr. Thomas Reinheckel (CTSB) und Prof. Dr. Paul Saftig (CTSD) zur Verfügung gestellt.

Zur Induktion einer akuten Colitis wurde den Mäusen über einen Zeitraum von 7 Tagen 2,5% (beim AC-Projekt) bzw. 3,5% (beim CTS-Projekt) Dextran Sodium Sulfat (DSS) im Trinkwasser verabreicht.

Die chronische Colitis wurde durch vier Zyklen mit 2,5% DSS für 7 Tage, unterbrochen von je 7 Tagen Wasser induziert. 4-6 Wochen nach dem letzten DSS-Zyklus manifestierte sich die chronische Colitis.

Bei der akuten DSS-Colitis wurden die Tiere am Tag 8 bzw. Tag 10 (CTS-Projekt) durch CO<sub>2</sub>-Vergasung getötet. Bei der chronischen Colitis wurden die Tiere 4 (AC-Projekt) bzw. 6 Wochen (CTS-Projekt) nach der letzten DSS-Gabe getötet. Der Dickdarm und die mesenterialen Lymphknoten wurden entnommen und für histologische und funktionelle Untersuchungen präpariert.



### 3.13.2. Cathepsin-Hemmung im akuten Colitis-Modell

Um den Einfluss der Cathepsine B und L auf die Pathogenese chronisch entzündlicher Darmerkrankungen *in vivo* zu untersuchen, wurden zunächst spezifische Inhibitoren im akuten DSS-Colitis-Modell der Maus eingesetzt. Die Inhibitoren für die akute DSS-Colitis wurden in sterilem PBS mit 5% DMSO gelöst und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Die Einzelhemmung von CTSB erfolgte durch 7 mg/kg Körpergewicht L-trans-Epoxy succinyl-Ile-Pro-OH Propylamid (CA-074, Bachem). Die Einzelhemmung von CTSL wurde durch 7 mg/kg Körpergewicht Z-Phe-Tyr-Aldehyd (Bachem) erreicht. Den Kontrollgruppen wurde jeweils PBS mit 5% DMSO verabreicht. Das Injektionsvolumen betrug jeweils 200 µl. Jede Gruppe bestand aus 5 Mäusen. Die Tiere wurden täglich gewogen und auf Vitalität und Stuhl beurteilt. Ab Tag 3 der DSS-Gabe wurden die Inhibitoren sieben Tage lang einmal täglich intraperitoneal appliziert. Nach sieben Tagen DSS-Gabe bekamen die Mäuse wieder Trinkwasser verabreicht. Einen Tag nach der letzten Inhibitor-Applikation wurde der Versuch beendet.

### 3.13.3. CTSB- bzw. -CTSD Knock-out in der chronischen Colitis

Die Auswirkungen des CTSB bzw. CTSD Einzelknock-outs wurden im chronischen DSS-Colitis-Modell der Maus getestet. Die benötigten Tiere wurden selbst gezüchtet und genotypisiert (3.2).

Für CTSD konnten lediglich heterozygote Knock-out Tiere gezüchtet werden, da der homozygote Knock-out letal ist. Die gezüchteten Wildtypmäuse wurden als Kontrolle verwendet. Für CTSB gab es drei Gruppen: Wildtyp (Kontrolle), heterozygote Knock-out Gruppe und die homozygote Knock-out Gruppe. Jede Gruppe bestand aus 11-13 Mäusen.

### 3.13.4. Getrocknete Heidelbeeren und Anthocyanextrakt in der experimentellen Colitis

Der Einfluss von getrockneten Heidelbeeren (gHB) bzw. des Anthocyanextraktes wurde jeweils im akuten als auch im chronischen DSS-Colitis-Modell der Maus getestet.

Um eine gleichmäßige Aufnahme der Substanzen zu gewährleisten, wurden diese unter das normale Mausfutter gemischt und dieses anschließend pelletiert (Ssniff GmbH). Die Mäuse erhielten während der gesamten Versuchsdauer das Spezialfutter. Erst zwei Wochen nach Beginn der Diät wurde mit der DSS-Gabe begonnen.

### 3.14. Histologischer Score

Zur Beurteilung des histologischen Scores als Maß für den Entzündungsgrad wurde 1 cm des distalen Drittels des Kolons jeder Maus entfernt, in Paraffin eingebettet, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt (3.11.1) und verblindet bewertet (150). Jeder histologische Score repräsentiert den Mittelwert dreier Gewebeschnitte und setzt sich wie folgt zusammen:

- Epithel: (E) 0: normale Morphologie, 1: Verlust einzelner Becherzellen, 2: Verlust von Becherzellen in großen Arealen, 3: Verlust von einzelnen Krypten, 4: Verlust von Krypten in großen Arealen
- Infiltration: (I) 0: kein Infiltrat, 1: geringe Infiltration um die Kryptenbasis, 2: Infiltrat reicht bis an die *L. muscularis mucosae*, 3: extensive Infiltration bis zur *L. muscularis mucosae* und Verdickung der Mukosa mit zahlreichen Ödemen, 4: Infiltration der Submukosa

Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe des Epithel- und des Infiltrationsscores.

### **3.15. Apoptotischer Score**

Zur Beurteilung des apoptotischen Scores wurde das bereits für den histologischen Scores angewandte Gewebe verwendet, mittels des TUNEL-Assays (3.11.3) gefärbt und verblindet bewertet. Der apoptotische Score setzt sich wie folgt zusammen: 0: keine apoptotischen Zellen, 1: wenige vereinzelte apoptotische Zellen, 2: vereinzelte apoptotische Zellen und kleine Areale apoptotischer Zellen, 3: viele vereinzelte apoptotische Zellen und viele Areale apoptotischer Zellen.

### **3.16. Statistische Auswertung**

Alle Messwerte sind als Mittelwerte ( $\pm$  Standardabweichung oder standard error of the mean) dargestellt. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der SigmaStat 3.0 Software. Verwendet wurden der Student t-Test bzw. Mann-Whitney Rank Sum Test. Unterschiede wurden als signifikant definiert, wenn  $p < 0,05$ .

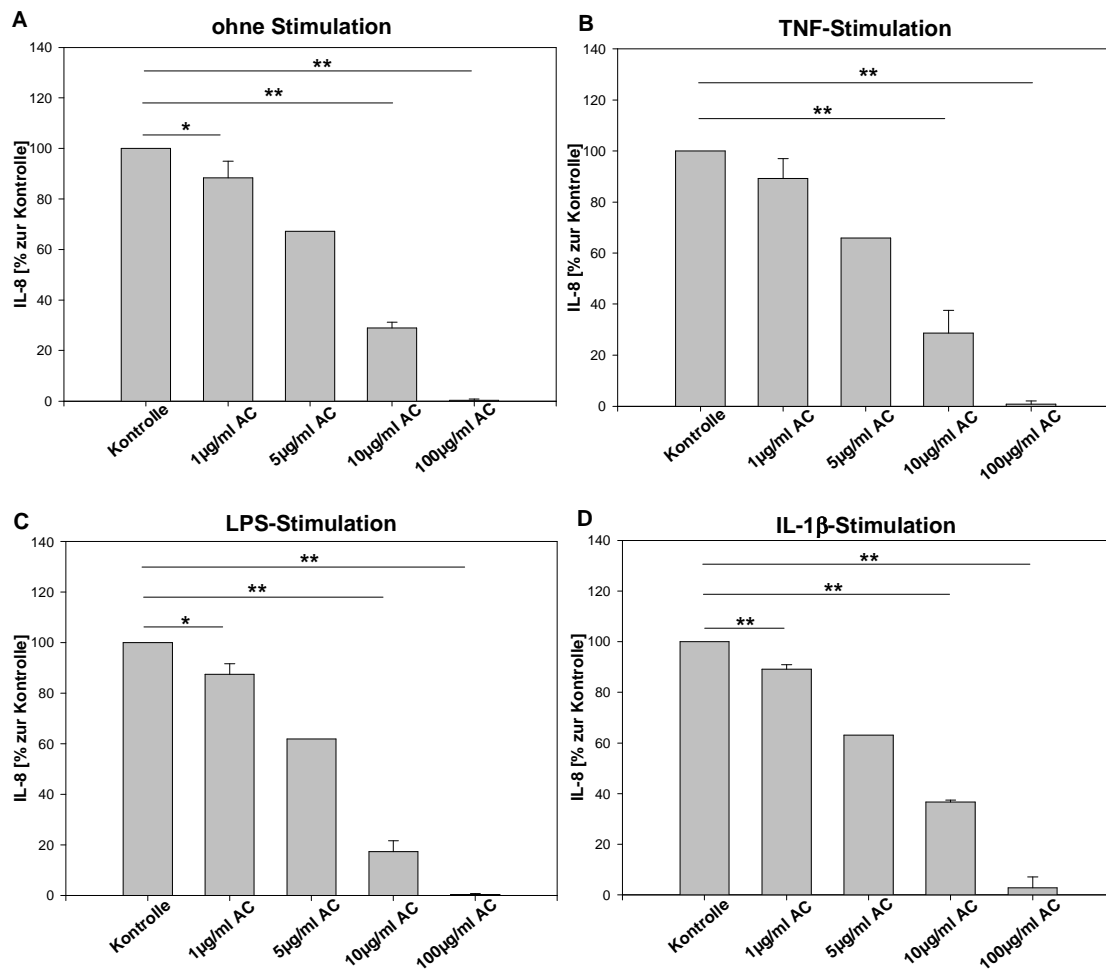
## **4. Ergebnisse**

### **4.1. Einfluss von AC auf die humane Makrophagenzelllinie MM6**

#### **4.1.1. Welcher Signalweg wird in MM6 durch AC beeinflusst?**

AC haben verschiedene protektive Eigenschaften, unter anderem wirken sie anti-oxidativ und anti-entzündlich. Es ist bekannt, dass sie in Endothelzellen den CD-40 vermittelten pro-inflammatorischen Signalweg unterdrücken und in Monozyten in der Lage sind, die Sekretion von TNF und IL-8 zu reduzieren (1.4.2). In dieser Arbeit sollte ihre anti-entzündliche Wirkung in einer humanen Makrophagenzelllinie (MM6) untersucht werden und ein möglicher, durch sie regulierter, Signalweg identifiziert werden. Dafür wurden MM6 Zellen ü.N. in Medium ohne FCS ausgesät und dann mit TNF, LPS oder IL-1 $\beta$  (je 10ng/ml) stimuliert und gleichzeitig mit verschiedenen Konzentrationen des AC-Extraktes inkubiert. Die Zugabe des Extraktes wurde nach 4h noch einmal wiederholt, da dieser in wässrigen Lösungen nicht stabil ist. Als Kontrolle wurde Medium verwendet. Nach 20h wurden die Überstände abgenommen und die IL-8 Konzentration mittels ELISA gemessen (Abb.4.1).

In allen Stimulationsansätzen führte eine steigende AC-Konzentration, dosisabhängig zu einer signifikanten Reduktion der IL-8 Sekretion. Dieser Effekt kann auch in der Probe ohne Stimulation beobachtet werden (Abb.4.1).



**Abb. 4.1: IL-8 Sekretion von MM6 Zellen in Anwesenheit verschiedener AC-Konzentrationen.**

Die Zellen wurden mit je 10ng/ml TNF (B), LPS (C) oder IL-1 $\beta$  (D) stimuliert. In Anwesenheit verschiedener AC-Konzentrationen kommt es zur signifikanten Reduktion der IL-8 Sekretion unabhängig vom Stimulans (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,001$ ). Die IL-8 Sekretion nimmt dosisabhängig ab, auch bei der Probe ohne Stimulation (A). Die Abbildung zeigt die Auswertung von drei unabhängigen Experimenten (die Daten zu 5 µg/ml AC-Konzentration stammen aus nur einem Experiment).

Zum besseren Überblick der prozentualen Abnahme der IL-8 Sekretion mit steigender AC-Konzentration in den einzelnen Ansätzen sind diese in Tabelle 4.1 noch einmal aufgelistet. Die Tabelle stellt auch die IL-8 Produktionen in pg/ml dar.

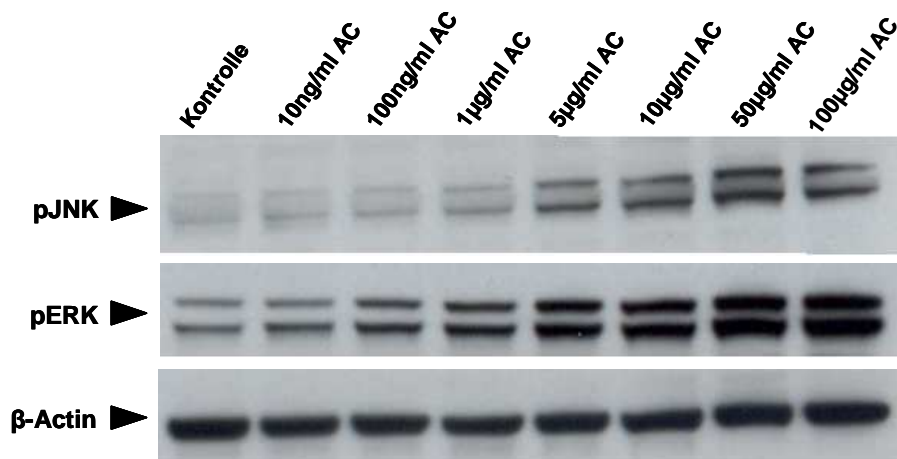
	Kontrolle	1µg/ml	5µg/ml	10µg/ml	100µg/ml
<b>ohne Stimulation</b>	100%	88,34%	67,20%	28,91%	0,32%
	17884 pg/ml	16814 pg/ml	1258 pg/ml	5550 pg/ml	46 pg/ml
<b>10ng/ml TNF</b>	100%	89,28%	65,92%	28,60%	0,84%
	27483 pg/ml	22671 pg/ml	3240 pg/ml	5612 pg/ml	166 pg/ml
<b>10ng/ml LPS</b>	100%	87,48%	61,94%	17,29%	0,35%
	37186 pg/ml	31897 pg/ml	9286 pg/ml	7095 pg/ml	168 pg/ml
<b>10ng/ml IL-1β</b>	100%	89,21%	63,12%	36,72%	2,80%
	22111 pg/ml	19857 pg/ml	1524 pg/ml	8106 pg/ml	292 pg/ml

**Tab. 4.1: IL-8 Sekretion von MM6 und deren prozentuale Abnahme.**

Die basale IL-8 Sekretion (ohne Stimulation) ist sehr hoch. Durch Stimulation mit IL-1β wird die IL-8 Sekretion um 23,5%, mit TNF um 53,7% und durch LPS um 107,9% gesteigert. Die prozentuale Abnahme der IL-8 Sekretion bei den einzelnen AC-Konzentrationen ist bei den verschiedenen Stimulationsansätzen ähnlich. Den deutlichsten Unterschied erhält man durch Stimulation mit LPS bei einer AC-Konzentration von 10µg/ml.

Die basale IL-8 Sekretion (ohne Stimulation) war sehr hoch, da die Zellen im Mangelmedium Stress ausgesetzt waren. Durch die verschiedenen Stimulanzen wurde die IL-8 Produktion gesteigert, wobei LPS den deutlichsten Anstieg hervorrief. Anhand der Tabelle erkennt man, dass die AC-dosisabhängige Abnahme zwischen den verschiedenen Stimulationsansätzen ähnlich ist. Den deutlichsten Unterschied erreicht man in der mit LPS stimulierten Probe bei einer Dosis von 10µg/ml AC-Extrakt.

Aufgrund dieser Daten ist kein Signalweg in den MM6-Zellen erkennbar, der durch AC beeinflusst wird. Da man auch in der Probe ohne Stimulation eine dosisabhängige Abnahme von IL-8 beobachten konnte, wurde dieser Ansatz wiederholt und die MM6-Zellen nach 20h lysiert. Mittels des Westernblots erfolgte der Nachweis verschiedener, aktivierter Kinasen (Abb. 4.2).



**Abb. 4.2: Westernblot von MM6-Zellen in Anwesenheit verschiedener AC-Konzentrationen.**

Durch die steigenden AC-Konzentrationen kommt es dosisabhängig zu einem Anstieg der Phosphorylierung der Kinasen JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase). Der Ladungsnachweis erfolgte durch die Detektion von  $\beta$ -Actin.

Untersucht wurden unter anderem die Kinasen JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und ERK (Extracellular-signal Regulated Kinase), die zu den MAP-Kinasen gehören. JNK ist in eine Signalkaskade eingebunden, an deren Anfang Stressfaktoren stehen, weshalb sie auch Stresskinase genannt wird. Unter anderen ist von JNK bekannt, dass sie anti-apoptotische Proteine wie Bcl-2 inaktiviert und pro-apoptotische Faktoren wie Bax aktiviert. Der Westernblot zeigt, dass mit zunehmender AC-Konzentration die Phosphorylierung der Kinasen ERK und JNK zunimmt.

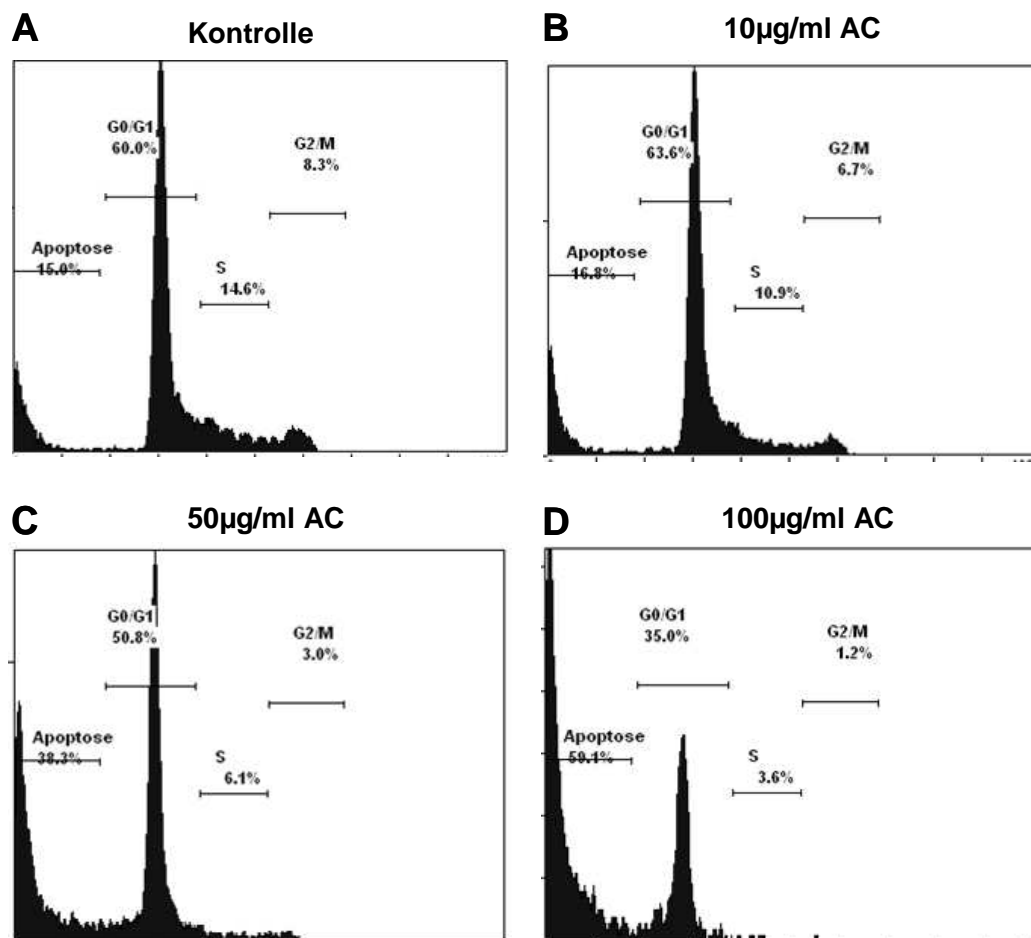
Es zeigte sich somit, dass AC die MAP-Kinasen ERK und JNK induzieren. Durch welchen Mechanismus die Aktivierung der MAP-Kinasen dann zu einer Reduktion der TNF/LPS/IL-1 $\beta$  stimulierten IL-8 Sekretion führt, bleibt jedoch unklar.

#### 4.1.2. Induzieren hohe AC-Konzentrationen Apoptose?

Da es sich bei JNK um eine Stresskinase handelt, die unter anderem Apoptose induziert und diese dosisabhängig zur AC-Konzentration phosphoryliert wird, sollte untersucht werden, ob der AC-Extrakt in den MM6-Zellen Apoptose auslöst. Eine vermehrte Apoptose durch steigende AC-Konzentrationen könnte auch ein Grund für die verminderte IL-8 Sekretion sein. Um dies zu klären wurden die Zellen über Nacht in Mangelmedium inkubiert und dann verschiedene AC-Konzentrationen zupipettiert. Nach 20h wurden die Zellen fixiert und die DNA mit Propidiumiodid gefärbt (3.9.3.1). Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde mittels der Zell-Zyklus-Analyse am Durchflusszytometer bestimmt (3.9.3.2).

Die Anwesenheit von mäßigen AC-Konzentrationen hat keinen Einfluss auf den präG1-Peak und somit auf die Apoptoserate. Eine Konzentration von 10µg/ml AC-Extrakt zeigt nahezu die gleiche Apoptoserate wie die Kontrolle. Jedoch kommt es durch die Anwesenheit sehr hoher AC-Konzentrationen zu einer deutlichen Erhöhung der Apoptoserate. So liegt diese bei einer AC-Konzentration von 50µg/ml bei 38,3% (Abb. 4.3 C) und bei 100µg/ml sogar bei 59,1% (Abb. 4.3 D).

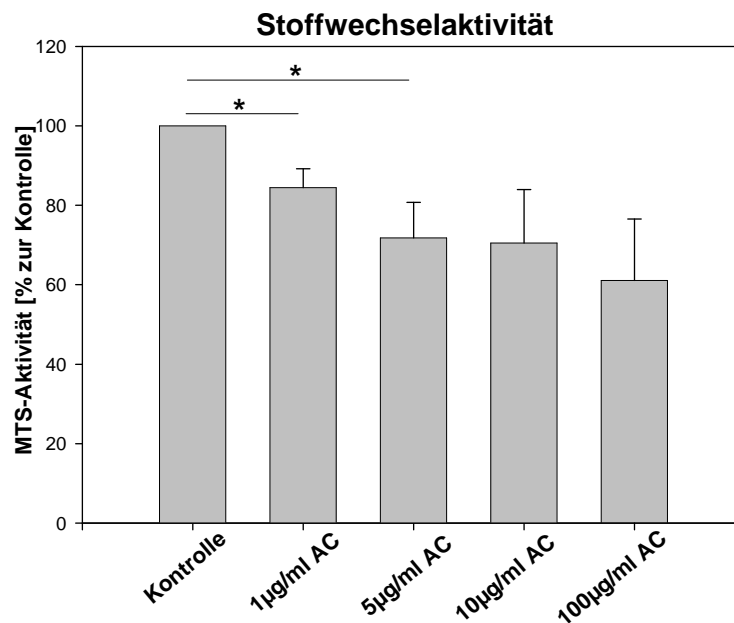




**Abb. 4.3: Apoptosenachweis in MM6-Zellen in Anwesenheit verschiedener AC-Konzentrationen.**

Die Apoptoserate bei einer AC-Konzentration von 10µg/ml liegt bei 16,8% (B) und entspricht nahezu der Kontrolle (A), die eine Apoptoserate von 15,0% zeigt. Durch sehr hohe AC-Konzentrationen kommt es zu einer gesteigerten Apoptoserate, wobei diese bei 50µg/ml 38,3% (C) und bei 100µg/ml AC-Extrakt sogar 59,1% (D) erreicht.

Um diese Ergebnisse zu untermauern, wurde unter den gleichen Bedingungen auch ein Stoffwechselaktivitätstest durchgeführt. Dazu wurden die Zellen nach einer 20-stündigen Inkubationszeit mit verschiedenen AC-Konzentrationen mit Tetrazoliumsalz (MTS) versetzt und die Extinktion nach 4h gemessen (3.10). Lebende Zellen sind in der Lage durch Dehydrogenasen das gelbe Tetrazoliumsalz in das rote Formazan umzuwandeln, so dass eine stärkere Rotfärbung einer höheren Zahl lebender Zellen entspricht (Abb. 4.4).



**Abb. 4.4: Stoffwechselaktivität der MM6-Zellen in Anwesenheit verschiedener AC-Konzentrationen.**

Die Anwesenheit des AC-Extraktes führt dosisabhängig zu einer reduzierten Stoffwechselaktivität. Bei 100µg/ml AC-Konzentration beträgt die Aktivität nur 60%. Die Abbildung stellt die Auswertung von zwei unabhängigen Experimenten dar (\*  $p < 0,05$ ).

Der Stoffwechselaktivitätstest zeigt, dass es mit steigender AC-Konzentration zu einer Reduktion der Stoffwechselaktivität kommt. Die Anwesenheit von 100µg/ml AC-Extrakt bewirkt eine Reduktion um 40% gegenüber der Kontrolle. Die Daten des Stoffwechselaktivitätstests bestätigen somit die Daten der Apoptosemessung im Durchflusszytometer (Abb. 4.3). Bei geringen AC-Konzentrationen sind die Zellen metabolisch aktiv und die Anzahl abgestorbener Zellen ist vergleichbar mit den Kontrollen (Zellen ohne AC-Extrakt). Hohe AC-Konzentrationen wirken jedoch zytotoxisch, was mit einer erhöhten Apoptoserate und einem Rückgang der Stoffwechselaktivität einhergeht.

Die Untersuchungen an der humanen Makrophagenzelllinie MM6 haben gezeigt, dass es durch die Anwesenheit des AC-Extraktes dosisabhängig zu einer Abnahme der IL-8 Sekretion kommt. Diese ist bei geringen AC-Konzentrationen mit der anti-entzündlichen Wirkung der AC zu erklären. Die Daten der Apoptosemessung und des Stoffwechselaktivitätstest deuten jedoch darauf hin, dass die Abnahme von IL-8 bei hohen AC-Konzentrationen zytotoxisch bedingt ist.

## **4.2. Einfluss von gHB und AC auf die experimentelle Colitis**

Berichte von MC-Patienten weisen darauf hin, dass durch den Verzehr von gHB die Schubfrequenz vermindert und der Verlauf eines Schubes gelindert wird. Da gHB zu ca. 10% aus AC bestehen, deren anti-entzündliche Eigenschaften bereits unter 1.4.2 beschrieben und in dieser Arbeit *in vitro* an humanen Makrophagen gezeigt werden konnten, sollte der Einfluss sowohl von gHB als auch von ihren AC auf das Ausmaß der Entzündung bei der experimentellen Colitis untersucht werden.

### **4.2.1. Wirkung der gHB und AC bei der akuten DSS-Colitis**

Zunächst sollte der Einfluss von gHB und deren AC im Modell der akuten Dextran Sodium Sulfat (DSS)-Colitis erforscht werden. Die Vorteile dieser chemisch induzierten Modell-Colitis liegen in ihrer Schnelligkeit, Effektivität und Reproduzierbarkeit (151). Durch orale DSS-Gabe über eine Woche kann eine akute Colitis induziert werden, die sich histologisch durch multiple Erosionen, Ulzerationen, den Verlust von Krypten und Makrophagen- bzw. Lymphozyteninfiltrationen auszeichnet. DSS wirkt hierbei toxisch auf das mukosale Epithel (verstärkte Apoptose von Epithelzellen), welches daraufhin von Makrophagen phagozytiert wird. Durch den daraus resultierenden epithelialen Barriereverlust kommt es zum Kontakt zwischen luminalen

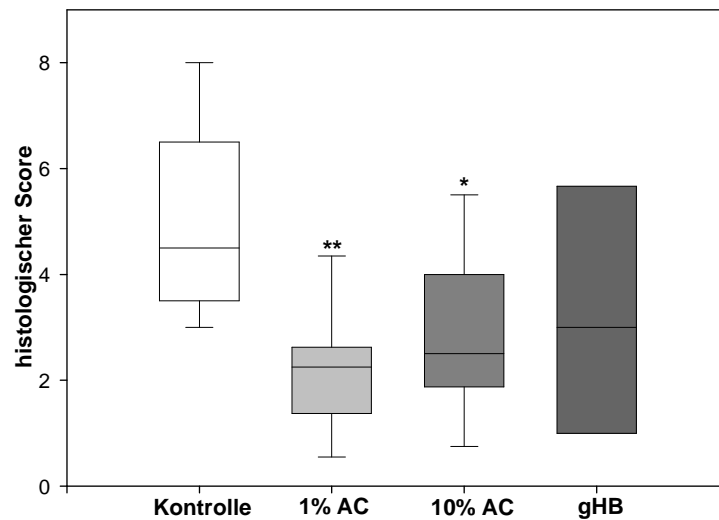
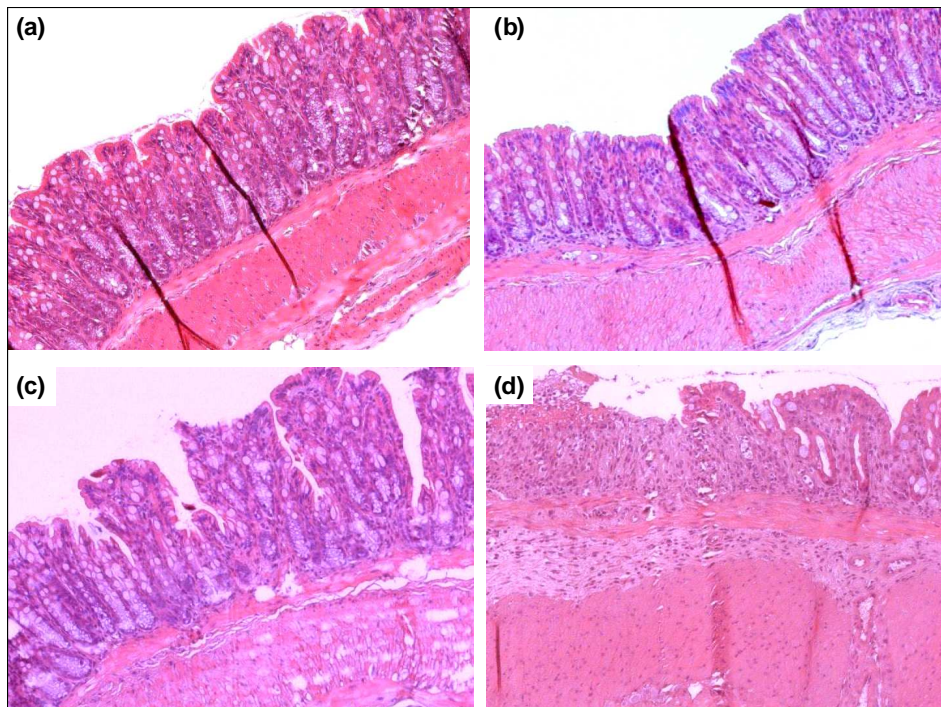
Antigenen und den Lymphozyten der *Lamina propria*, welche dadurch zusätzlich zur Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine stimuliert werden.

Die Mäuse wurden mit Futterpellets, die mit 0,1%, 1% und 10% AC-Extrakt bzw. 20% gHB vermischt wurden, gefüttert. Die Kontrollgruppe erhielt normale Futterpellets. Zwei Wochen nach Beginn der Diät wurde die akute Colitis durch DSS-haltiges Trinkwasser induziert. Nach einer Woche wurden die Tiere getötet und das Kolon und die mesenterialen Lymphknoten entnommen (3.13.1).

#### **4.2.1.1. Histologie bei der akuten Colitis**

Zur Beurteilung des histologischen Scores als Maß für den Entzündungsgrad wurde ein distales Stück des Kolons jeder Maus entfernt, in Paraffin eingebettet, mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und verblindet bewertet (3.14). Es wurden sowohl der Epithelschaden, als auch das entzündliche Infiltrat begutachtet. Jeder histologische Score repräsentiert den Mittelwert dreier Gewebeschnitte einer Maus. Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe des Epithel- und des Infiltrationsscores. Die histologischen Scores der einzelnen Gruppen sind in Abb. 4.5 A dargestellt.

Die Gabe von 1% bzw. 10% AC zum Futter führte zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Scores verglichen mit den Kontrollmäusen, die DSS und normales Futter erhielten. Der Verzehr von gHB bewirkte ebenfalls eine Besserung des histologischen Scores, wenngleich diese keine Signifikanz erreichte. So wurde durch 10% AC eine Reduktion um 43%, durch 1% AC sogar eine Besserung um 56% erreicht. Durch gHB konnte der histologische Score um 35% gebessert werden. In Abb.4.5 B sind exemplarisch HE-gefärbte Kolonschnitte der einzelnen Gruppen dargestellt. In den Gewebeschnitten beider AC-Gruppen erkennt man deutlich die erhaltene Struktur des Epithels mit einer normalen Anzahl an Becherzellen, sowie eine mäßige Infiltration mit Leukozyten (Abb. 4.5 B (a) und (b)). Im Gegensatz dazu ist das Epithel der Kontrolltiere durch einen deutlichen Verlust der Krypten und das Gewebe durch eine starke Leukozyteninfiltration bis hin zur *Lamina submucosae*

**A****B**

**Abb. 4.5: Histologie bei der akuten Colitis.**

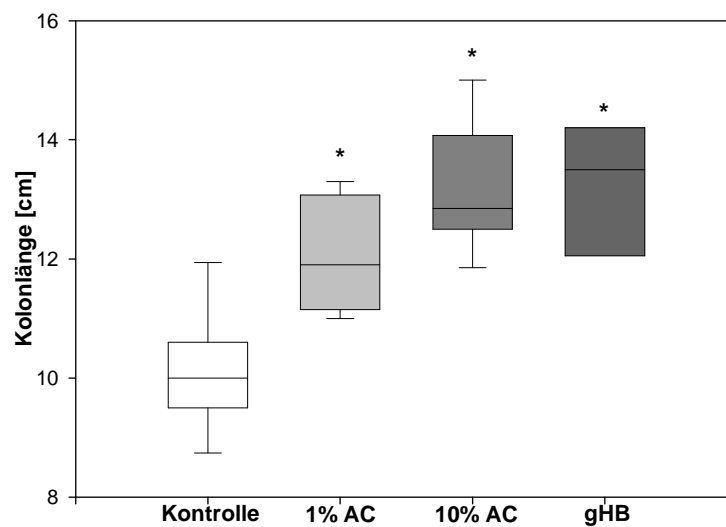
**(A)** Histologisches Ausmaß der DSS-induzierten Colitis bei Mäusen mit Normalfutter (Kontrolle; n=15), mit 1% (n=10) bzw. 10% (n=14) AC-Konzentration und mit gHB (n=5). Der Verzehr von AC führte zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Scores (\*  $p=0,001$ ; \*\*  $p<0,001$ ). gHB führten zu einer nicht signifikanten Reduktion. Die Vergabe des histologischen Scores erfolgte verblindet durch eine unabhängige Person. **(B)** Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnittes der Histologie für jede Gruppe. **(a)** 1% AC **(b)** 10% AC **(c)** gHB **(d)** Kontrolle. Vergrößerung 100x.

gekennzeichnet (Abb.4.5 B (d)). In der Gruppe mit einer AC-Konzentration von nur 0,1% kam es zu keiner Verbesserung des histologischen Scores (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.1.2. Kolonlänge bei der akuten Colitis**

Im Verlauf der DSS-induzierten Colitis kommt es typischerweise zu einer deutlichen Reduktion der Kolonlänge, sowie durchfalltypischen Symptomen wie weichen, ungleichmäßig verteilten Faeces. Aufgrund der Entzündung wandern verstärkt Leukozyten in die Mukosa ein, so dass es zu einer Verdickung der Darmwand kommt. In Abb. 4.6 A ist exemplarisch von jeder Gruppe ein Kolon dargestellt, die Abb. 4.6 B zeigt die Auswertung der Kolonlängen.

Die entnommenen Därme zeigen bereits makroskopisch deutliche Unterschiede. Das Kolon von Mäusen, die zusätzlich mit gHB bzw. 1% und 10% AC gefüttert wurden, war durch eine dünne Darmwand und eine gleichmäßige Verteilung der Faeces gekennzeichnet (Abb.4.6 A (b-d)). Im Gegensatz dazu waren die Därme der Kontrolltiere (DSS ohne gHB oder AC) deutlich verkürzt, die Darmwand stark verdickt und die Faeces ungleichmäßig verteilt (Abb.4.6 A (a)), was wie bereits erwähnt charakteristische Zeichen für eine starke Entzündung sind. Die Fütterung von gHB und höheren AC-Konzentrationen wirkte sich damit positiv auf die Kolonlänge aus. So war das Kolon von Mäusen, die mit gHB gefüttert wurden, im Mittel um 29% länger als das der Kontrolltiere. Die gleiche Beobachtung konnte man bei Mäusen machen, die mit 1% bzw. 10% AC-Extrakt gemischtes Futter erhielten. Deren Därme waren ebenfalls deutlich weniger verkürzt (19% bzw. 28%) verglichen mit den Kontrollen. Die Fütterung von 0,1% AC zeigte keine Wirkung auf die Kolonlänge. Im Mittel war das Kolon dieser Gruppe genauso stark verkürzt wie das der Kontrollgruppe (Daten nicht gezeigt).

**A****B**

**Abb. 4.6: Kolonlänge.**

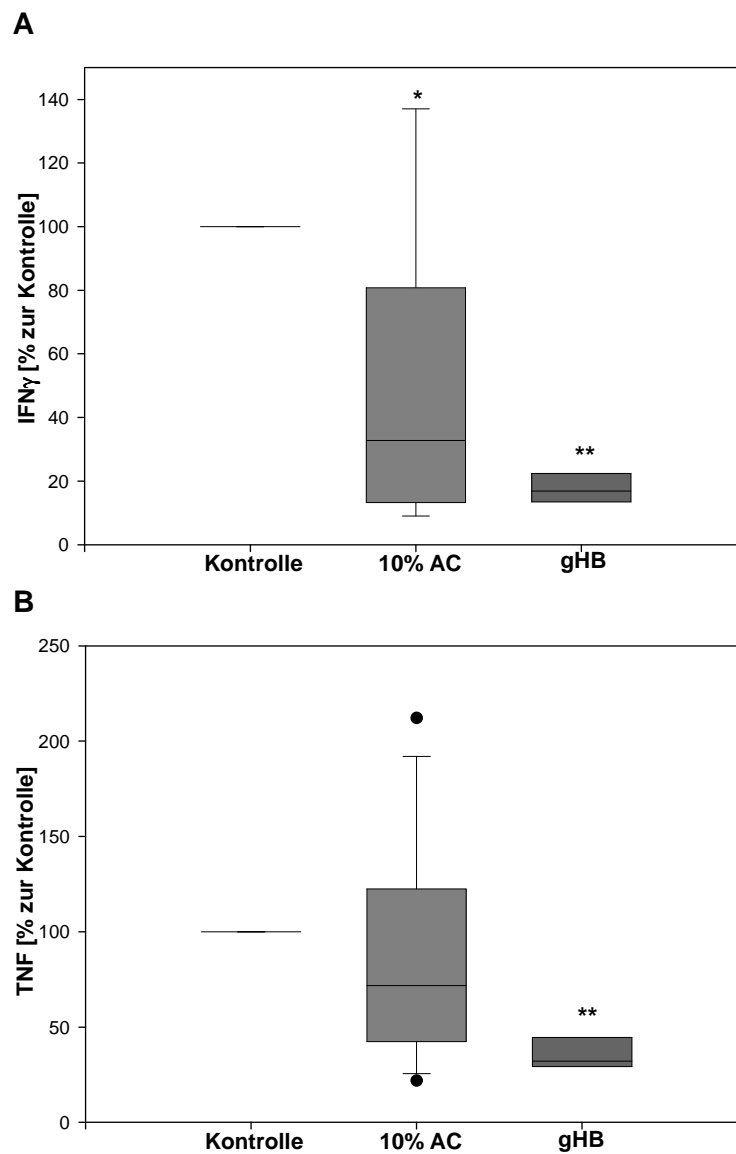
(A) Exemplarische Darstellung eines Kolons jeder Gruppe. (a) Kontrolle, (b) 1% AC, (c) 10% AC, (d) gHB. (B) Kolonlängen. Im Mittel war das Kolon der behandelten Gruppe mit 1% AC um 19%, mit 10% AC um 28% und mit gHB um 29% länger als das Kolon der Normalfuttergruppe. Die Unterschiede waren signifikant (\*  $p < 0,001$ ).

#### **4.2.1.3. Zytokinsekretion bei der akuten Colitis**

Den Mäusen wurden die mesenterialen Lymphknoten für die Bestimmung der Zytokinsekretion entnommen und die Lymphknotenzellen isoliert (3.1.1.5). Anschließend wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine TNF und IFN $\gamma$  bestimmt.

Sowohl gHB als auch eine 10%ige AC-Konzentration bewirkten während der akuten Colitis eine signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion. In der Gruppe mit gHB konnte die IFN $\gamma$ -Sekretion um 80%, in der 10% AC-Gruppe um 50% verringert werden (Abb. 4.7 A). Darüber hinaus zeigte sich, dass durch die Fütterung von gHB auch die TNF-Sekretion deutlich gesenkt wurde (um 64% gegenüber der Kontrollgruppe). In der Gruppe mit 10% AC kam es nur zu einer leichten Reduktion von TNF (Abb. 4.7 B). Die geringeren AC-Konzentrationen von 0,1% und 1% hatte keinen Einfluss auf die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und TNF (Daten nicht gezeigt).





**Abb.4.7: Zytokinsekretion.**

**(A)** IFN $\gamma$ -Sekretion. Der Verzehr von gHB und 10% AC bewirkte eine signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion, wobei gHB die Sekretion um 80% (\*\*  $p < 0,001$ ), 10% AC um 50% (\*  $p = 0,001$ ) gegenüber der Kontrolle senkten. **(B)** TNF-Sekretion. Die Sekretion von TNF wurde durch gHB signifikant um 64% (\*\*  $p < 0,001$ ) reduziert. 10% AC-Konzentration zeigten eine leichte Reduktion.

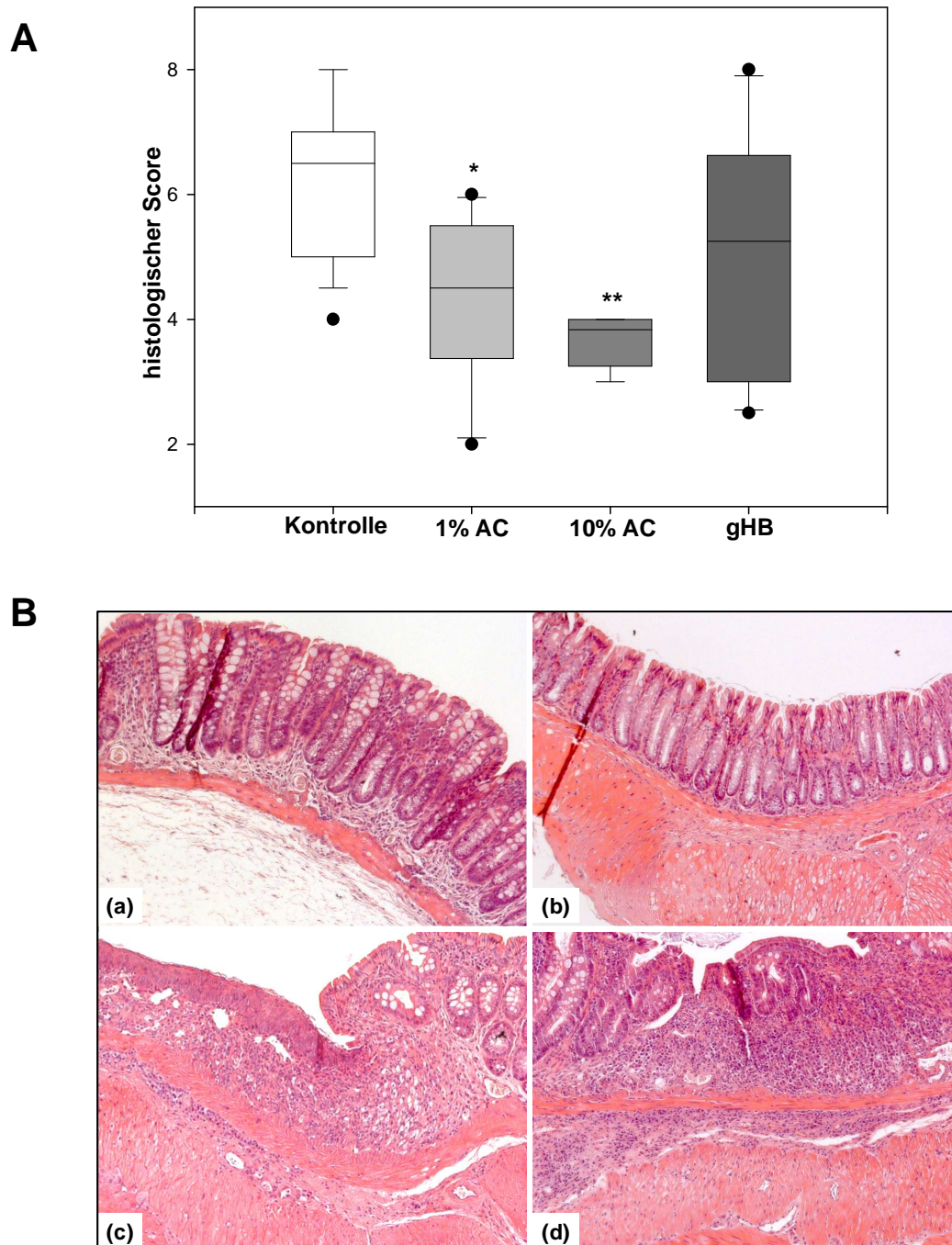
#### **4.2.2. Wirkung der gHB und deren AC bei der chronischen DSS-Colitis**

Nach den positiven Effekten der gHB und des AC-Extraktes in der akuten DSS-Colitis, sollte nun auch deren Einfluss in der chronischen Colitis untersucht werden, um deren Einsatz bei der Behandlung von CED zu prüfen. Auch hier wurden die Mäuse für zwei Wochen mit der speziellen Diät aus gHB bzw. den verschiedenen AC-Konzentrationen gefüttert, bevor mit der Induktion der chronischen Colitis durch vier Zyklen DSS begonnen wurde. Vier Wochen nach der letzten DSS-Gabe hatte sich die chronische Colitis manifestiert. Der Versuch wurde beendet und das Kolon und die mesenterialen Lymphknoten entnommen (3.13.1).

##### **4.2.2.1. Histologie bei der chronischen Colitis**

Zur Beurteilung des histologischen Scores als Maß für den Entzündungsgrad wurde ein distales Stück des Kolons jeder Maus entfernt und nach der Hämatoxylin-Eosin Färbung verblindet bewertet (3.14). Es wurden sowohl der Epithelschaden, als auch das entzündliche Infiltrat begutachtet. Der Gesamtscore ergibt sich aus der Summe des Epithel- und des Infiltrationsscores. Die histologischen Scores der einzelnen Gruppen sind in Abb. 4.8 A dargestellt.

Die Gabe von 1% bzw. 10% AC-haltigem Futter führte zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Scores verglichen mit den Kontrollmäusen, die DSS und normales Futter erhielten. Der Effekt war dosisabhängig, da 1% AC die Entzündung um 29%, 10% AC sogar um 41% reduzierten. Der Verzehr von gHB bewirkte hingegen nur eine minimale Besserung des histologischen Scores und 0,1% AC zeigten gar keine Wirkung (Daten nicht gezeigt).



**Abb. 4.8: Histologie bei der chronischen Colitis.**

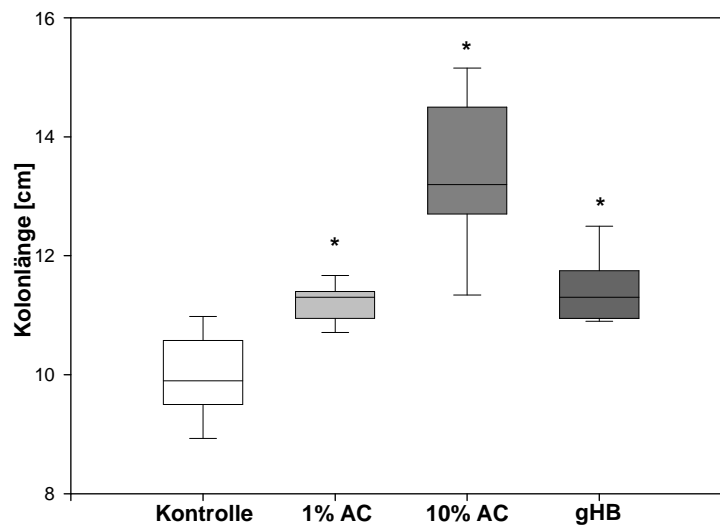
**(A)** Histologisches Ausmaß der chronischen Colitis bei Mäusen mit Normalfutter (Kontrolle; n=19), mit 1% (n=10) bzw. 10% (n=9) AC-Konzentration und mit gHB (n=10). Der Verzehr von AC führte zu einer signifikanten Reduktion des histologischen Scores (\*  $p=0,001$ ; \*\*  $p<0,001$ ). gHB bewirkten nur eine geringe Reduktion. **(B)** Exemplarische Darstellung eines typischen Ausschnittes der Histologie für jede Gruppe. **(a)** 1% AC **(b)** 10% AC **(c)** gHB **(d)** Kontrolle. Vergrößerung 100x.

In Abb. 4.8 B sind exemplarisch HE-gefärbte Kolonschnitte der einzelnen Gruppen dargestellt. In den Gewebeschnitten von Kontrollmäusen konnte ein kompletter Verlust des Epithels und eine große Anzahl von Entzündungszellen bis hin zur *Lamina submucosae* beobachtet werden (Abb. 4.8 B (d)). Im Gewebe von Mäusen, die mit gHB gefüttert wurden, waren deutlich weniger Entzündungszellen zu finden, dennoch wies das Epithel Schäden auf (Abb. 4.8 B (c)). Im Gegensatz dazu zeigten die Schnitte der 1% und 10% AC-Gruppen eine intakte Epithelstruktur und nur eine geringe Leukozyteninfiltration (Abb. 4.8 B (a, b)). In der Gruppe mit einer AC-Konzentration von nur 0,1% kam es zu keiner Verbesserung des histologischen Scores (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.2.2. Kolonlänge bei der chronischen Colitis**

Während der Colitis kommt es, wie bereits unter 4.2.1.2 ausführlich beschrieben, zu den typischen Symptomen wie Kolonverkürzung und Darmwandverdickung. In Abb. 4.9 A ist exemplarisch von jeder Gruppe ein Kolon abgebildet, die Abb. 4.9 B zeigt die Auswertung der Kolonlängen.

Bereits makroskopisch sind deutliche Unterschiede zu erkennen. Die Därme von Mäusen, die Futter mit gHB bzw. 1% und 10% AC erhielten, hatten dünne Darmwände und die Faeces waren gleichmäßig verteilt (Abb. 4.9 A (b-d)). Im Gegensatz dazu zeigte das Kolon der Kontrolltiere charakteristische Zeichen einer Entzündung. Diese waren deutlich verkürzt, ihre Darmwand stark verdickt und die Faeces ungleichmäßig verteilt (Abb. 4.9 A (a)).

**A****B**

**Abb. 4.9: Kolonlänge.**

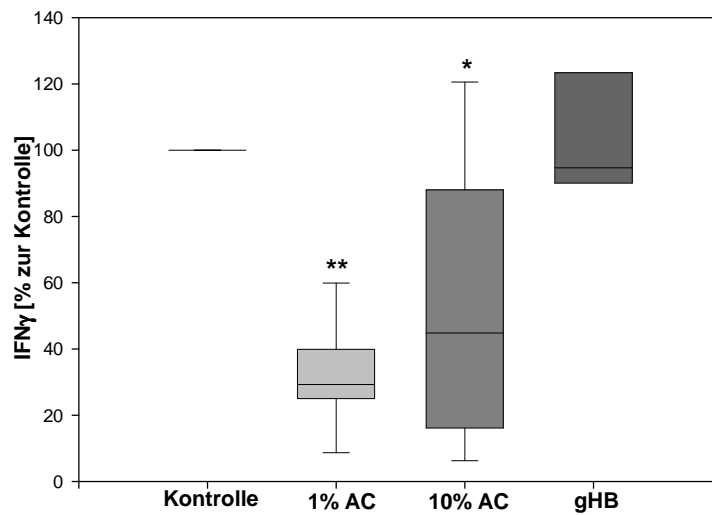
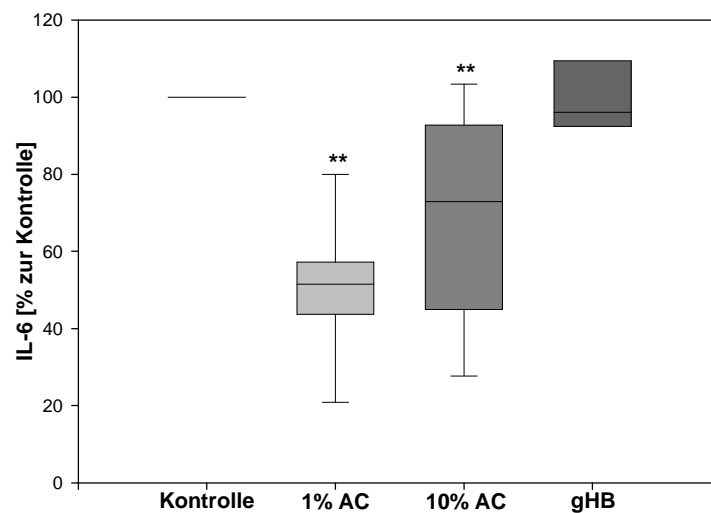
(A) Exemplarische Darstellung eines Kolons jeder Gruppe. (a) Kontrolle, (b) 1% AC, (c) 10% AC, (d) gHB. (B) Kolonlängen. Im Mittel war das Kolon der behandelten Gruppen mit 1% AC und gHB um 15%, mit 10% AC um 34% länger als das Kolon der Normalfuttergruppe. Die Unterschiede waren signifikant (\*  $p < 0,001$ ).

Die Gabe von gHB und höheren AC-Konzentrationen wirkte sich signifikant positiv auf die Kolonlänge aus. So war das Kolon von Mäusen, die mit gHB und 1% AC gefüttert wurden, um 15% länger als das der Kontrolltiere. 10% AC-Extrakt bewirkten sogar eine um 34% geringere Verkürzung der Därme. Der Verzehr von 0,1% AC zeigte keine Wirkung auf die Kolonlänge (Daten nicht gezeigt).

#### **4.2.2.3. Zytokinsekretion bei der chronischen Colitis**

Aus den mesenterialen Lymphknoten wurden die Lymphknotenzellen isoliert und nach einer 24-stündigen Inkubation mit und ohne CD3 die Überstände abgenommen (3.1.1.5). Anschließend wurde die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und IL-6 bestimmt.

Die Auswertung der Sekretion von IFN $\gamma$  ist in Abb. 4.10 A, die von IL-6 in Abb. 4.10 B dargestellt. Sowohl 1% als auch 10% AC-Konzentration bewirkten während der chronischen Colitis im Vergleich zu den Kontrollen eine signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ - und IL-6 Sekretion. Die Fütterung von 10% AC konnte die IFN $\gamma$ -Sekretion um 50%, die IL-6 Produktion um 30% verringern. Die Gabe von 1% AC zeigte einen noch deutlicheren Effekt. So wurde die IFN $\gamma$ -Sekretion um 70% und die IL-6 Sekretion um 50% reduziert. Im Gegensatz zur akuten Colitis konnten durch die gHB bei der chronischen Colitis keine anti-inflammatorischen Effekte beobachtet werden. Auch die niedrige AC-Konzentration von 0,1% konnte die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und IL-6 nicht reduzieren (Daten nicht gezeigt).

**A****B**

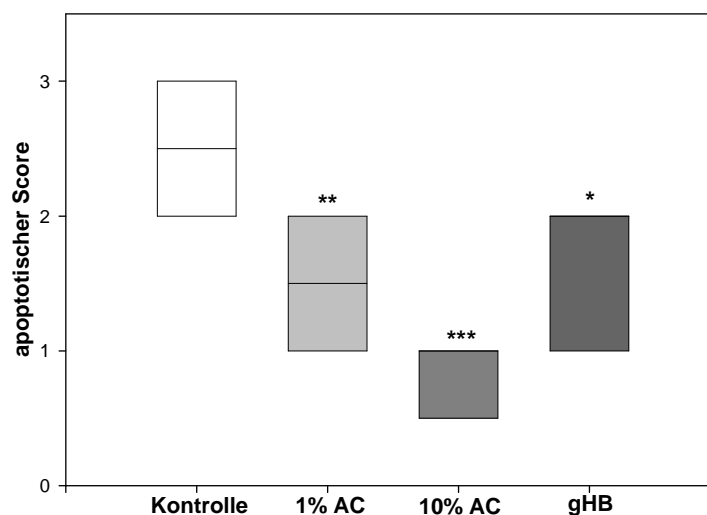
**Abb. 4.10: Zytokinsekretion bei der chronischen Colitis.**

**(A)** IFN $\gamma$ -Sekretion. Der Verzehr von 1% und 10% AC bewirkte eine signifikante Reduktion der IFN $\gamma$ -Sekretion, wobei 1% AC die Sekretion um 70% (\*\*  $p < 0,001$ ), 10% AC um 50% (\*  $p = 0,01$ ) gegenüber der Kontrolle senkten. **(B)** IL-6-Sekretion. Die Sekretion von IL-6 wird durch 1% AC signifikant um 50% und durch 10% AC um 30% (\*\*  $p < 0,001$ ) reduziert. gHB zeigten keine Reduktion von IFN $\gamma$  und IL-6.

#### 4.2.3. Einfluss von gHB und AC auf die Apoptose bei Colitis

Der Apoptose von Epithelzellen wird bei der Pathogenese und der Aufrechterhaltung der intestinalen Entzündung sowohl bei der chronischen DSS-Colitis als auch bei CED eine große Bedeutung zugeschrieben (152;153). Da die protektiven Eigenschaften von AC und gHB bereits in dieser Arbeit in der experimentellen Colitis beobachtet werden konnten, sollte des Weiteren das anti-apoptotische Potential dieser Substanzen untersucht werden.

Dafür wurde in Paraffin eingebettetes Kolongewebe mittels des TUNEL-Assays gefärbt, welcher dem Nachweis von fragmentierter DNA dient. Die apoptotischen Zellen wurden am Fluoreszenzmikroskop quantifiziert (3.11.3). Bei der Quantifizierung der akuten DSS-Colitis war kein einheitliches Bild erkennbar, bei der chronischen DSS-Colitis erhielt man jedoch deutliche Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen (Abb. 4.11).

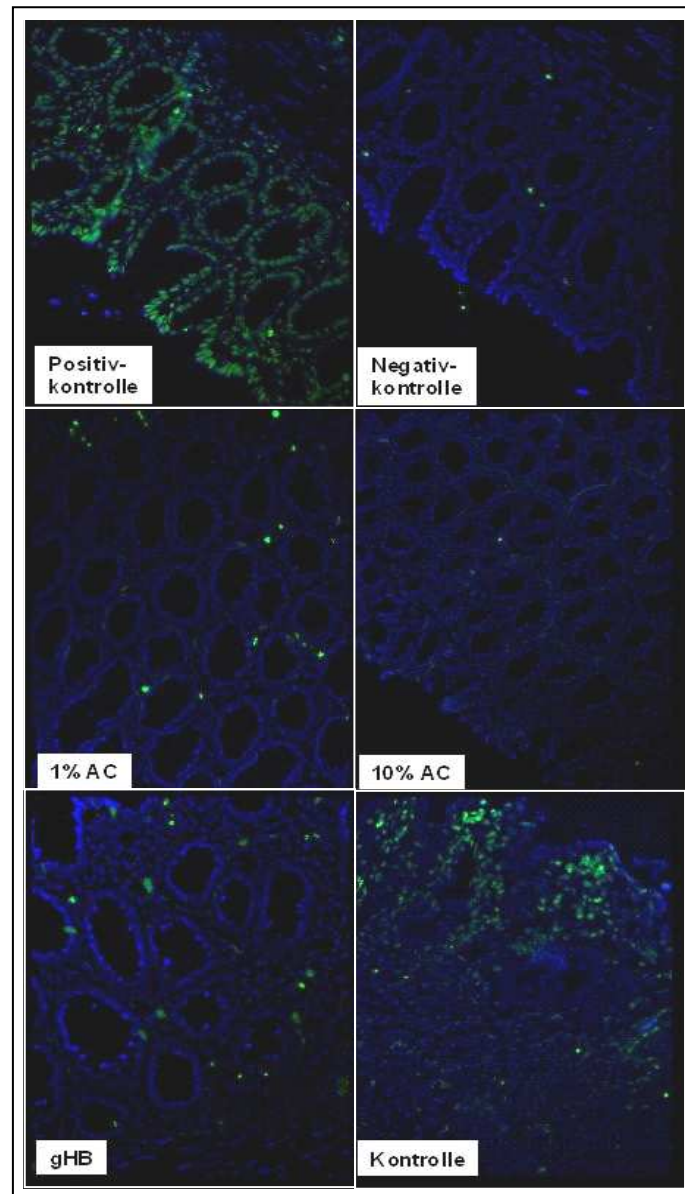


**Abb. 4.11: Apoptotischer Score bei der chronischen DSS-Colitis.**

Grad der Apoptose von Epithelzellen in Mäusen mit Normalfutter (Kontrolle; n=8), mit 1% (n=7) bzw. 10% (n=7) AC-Konzentration und mit gHB (n=5). Der Verzehr von gHB führte zu einer signifikanten Reduktion der Apoptose um 35% (\*  $p < 0,05$ ). Durch 1% AC konnte diese um 44% (\*\*  $p = 0,005$ ) und durch 10% AC sogar um 68% (\*\*\*)  $p < 0,001$ ) reduziert werden.



Die Auswertung zeigt, dass durch die Fütterung von gHB die Zahl apoptotischer Epithelzellen um 35% gegenüber der Normalfuttergruppe gesenkt werden konnte. Die AC inhibierten noch effektiver die Apoptose. So wurde der Grad der Apoptose durch 1% AC um 44% und durch 10% AC sogar um 68% reduziert.

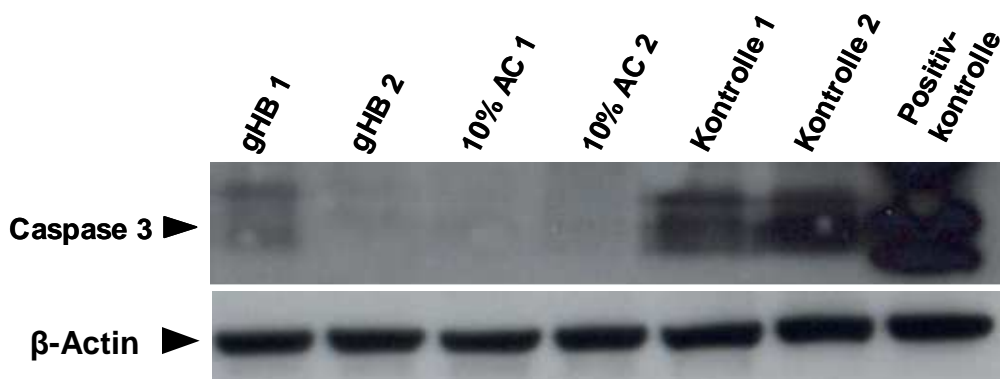


**Abb. 4.12: TUNEL-Assay von Kolongewebe.**

Exemplarische Darstellung der mit TUNEL-Assay gefärbten Kolonschnitte jeder Gruppe.

In Abb. 4.12 sind exemplarisch für jede Gruppe mit TUNEL-Assay-gefärbte Kolonschnitte dargestellt. In Gewebeproben von Kontrollmäusen findet man viele einzelne apoptotische Zellen und auch apoptotische Areale gleichmäßig über den gesamten Schnitt verteilt, während in Proben von Mäusen, die mit gHB gefüttert wurden nur wenige apoptotische Zellen oder kleine Areale beobachtet wurden. In Gewebeschnitten von Mäusen, die AC-Futter erhielten fand man hingegen keine bis unwesentliche Mengen an apoptotischen Epithelzellen.

Neben der Färbung von Kolongewebe mittels des TUNEL-Assays wurde auch die Aktivierung von Caspase-3 im Westernblot überprüft, einer Kinase, die Apoptose induziert. Dazu wurde Kolongewebe von Mäusen mit einer chronischen DSS-Colitis in RIPA-Puffer (2.3.1) lysiert und das Lysat anschließend sonikiert (2.11). Es konnte eine starke Aktivierung der Caspase-3 Kinase in Gewebelysaten von Mäusen, die Normalfutter erhielten (Kontrolle 1 und 2), sowie eine leichte Aktivierung in einer Probe mit gHB (gHB 1) beobachtet werden, während in beiden Proben der 10% AC-Gruppe keine Bande zu detektieren war (Abb. 4.13).



**Abb. 4.13: Westernblot der Caspase-3 Aktivierung.**

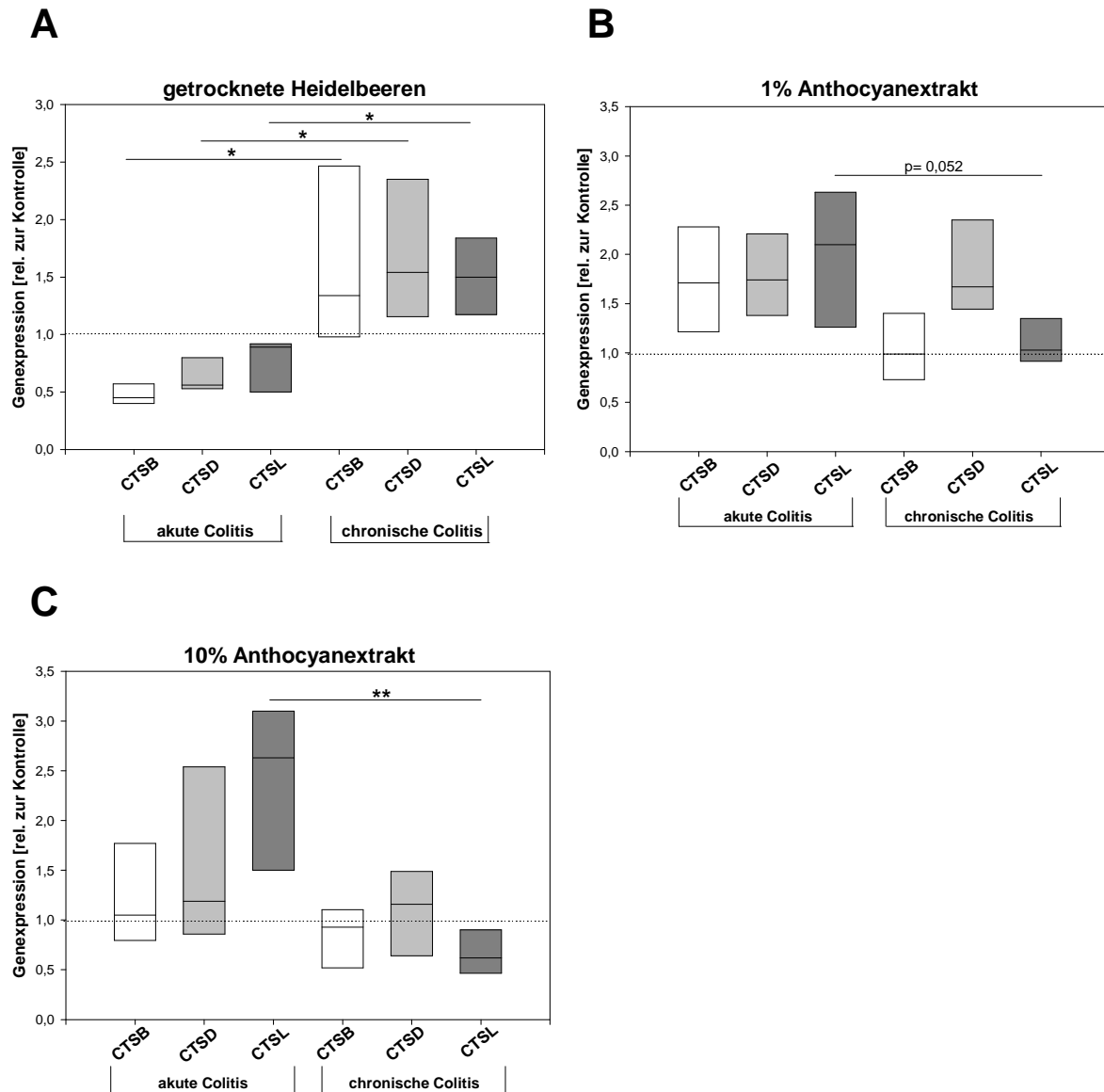
Verwendet wurden Kolonlysate von Mäusen mit einer chronischen DSS-Colitis, die gHB, 10% AC bzw. Normalfutter erhielten. Pro Gruppe sind Proben von je 2 Mäusen verwendet worden. Als Positivkontrolle diente ein Lysat mit apoptotischen Epithelzellen eines humanen Darmresektats. Der Ladungsnachweis erfolgte mit dem  $\beta$ -Actin Antikörper auf derselben Membran.

Anhand der Daten des TUNEL-Assays und des Caspase-3 Westernblots zeigte sich, dass durch die Fütterung von gHB und AC Apoptose in Epithelzellen bei der chronischen Colitis reduziert werden kann.

#### **4.3. Einfluss von gHB und AC auf die Expression von Cathepsinen**

Cathepsine (CTS) sind Proteasen, die unter anderem auch am Verdau extrazellulärer Matrixproteine beteiligt sind, weshalb ihr Einfluss bei CED in den letzten Jahren immer mehr in den Fokus von Forschungsarbeiten tritt (1.3.3.2). Ob ihre Expression und damit ihre gewebeschädigende Wirkung durch die Gabe von gHB oder AC gehemmt werden kann, sollte anhand der CTS B, D und L untersucht werden. Dazu wurde RNA aus Kolongewebe von Mäusen mit akuter bzw. chronischer DSS-Colitis isoliert (3.4.2) und in cDNA umgeschrieben (3.6). Mittels Real-Time-PCR mit SYBR-Green wurde die Expression von CTSB, CTSD und CTSL quantifiziert (3.8).

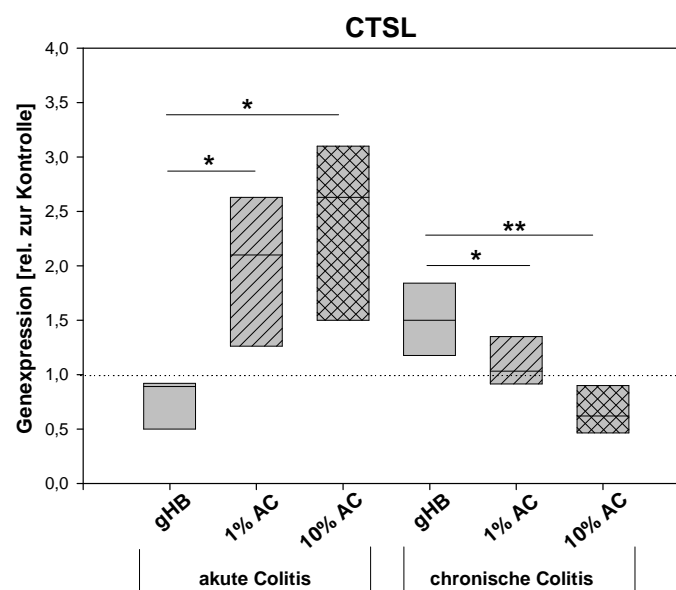
Die gemessene Expression wurde in Relation zur jeweiligen Kontrollgruppe gesetzt und ist in Abb. 4.14 dargestellt. Die Auswertung zeigt, dass durch die Fütterung von gHB alle drei untersuchten CTS in der akuten weniger und in chronischen Colitis höher exprimiert wurden. Die Unterschiede waren signifikant. In der Gruppe mit 1% AC-Konzentration kam es zu einer deutlich verstärkten CTS-Expression in der akuten Colitis. Die CTS B und L wurden in der chronischen Colitis nicht reguliert, die Expression von CTSD war jedoch fast doppelt so hoch verglichen mit der Kontrollgruppe. In der Gruppe, die 10% AC erhielt, konnte bei der akuten Colitis eine erhöhte Expression der CTS beobachtet werden, insbesondere von CTSL (2,4-fach). In der chronischen Colitis hingegen bewirkten 10% AC-Konzentration eine Reduktion von CTSB und CTSL. CTSD wurde jedoch auch in der Chronischen fast doppelt so hoch exprimiert, was schon in der Gruppe mit 1% AC zu beobachten war.



**Abb. 4.14: Real-Time-PCR von CTSB, CTSD und CTSL in Kolongewebe.**

Gezeigt ist die quantitative Genexpression jeder Gruppe bezogen auf die Kontrollgruppe. **(A)** Durch den Verzehr von gHB wird die Expression aller drei CTS reguliert. In der chronischen Colitis liegt deren Expression signifikant höher als in der akuten Colitis (\*  $p < 0,05$ ). **(B)** Durch 1% AC kommt es zu einer erhöhten bzw. gleich bleibenden Expression. **(C)** 10% AC bewirken eine Erhöhung der CTS-Expression in der akuten Colitis bzw. eine Reduktion von CTSB und CTSL (\*\*  $p < 0,005$ ) in der Chronischen (akute Colitis: gHB  $n=3$ ; 1% AC  $n=5$ ; 10% AC  $n=5$ ; chronische Colitis: gHB  $n=5$ ; 1% AC  $n=5$ ; 10% AC  $n=5$ ).

Die Auswertung zeigt, dass vor allem das CTSL stark reguliert wird (Abb. 4.15). Die gHB führen in der akuten Colitis zu einer geringeren Expression von CTSL gegenüber den Kontrolltieren, die Normalfutter erhielten. Durch AC wird die Expression dosisabhängig gesteigert. In der chronischen Colitis lässt sich ein umgekehrter Effekt beobachten. In der gHB-Gruppe ist die Expression am höchsten und durch AC lässt sie sich dosisabhängig senken. In der Gruppe mit 10% AC-Konzentration lag die CTSL-Expression sogar unterhalb der der Kontrolltieren.



**Abb. 4.15: Real-Time-PCR von CTSL in Kolongewebe.**

In der akuten Colitis wurde in der gHB-Gruppe die niedrigste CTSL-Expression beobachtet. Durch AC wurde diese dosisabhängig gesteigert. In der chronischen Colitis wurde ein umgekehrter Effekt erreicht (\*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,005$ ).

Davon ausgehend, dass CTS gewebeschädigende Eigenschaften besitzen, zeigen nur die gHB in der akuten Colitis und 10% AC in der chronischen Colitis eine protektive Wirkung. Durch sie konnten die CTS-Expressionen gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt werden. Jedoch ließ sich für gHB in der chronischen und für 10% AC in der akuten Colitis, sowie für 1% AC in beiden Ansätzen ein gegenteiliger Effekt beobachten. Die Genexpression wurde deutlich, gegenüber den Tieren die Normalfutter erhielten, gesteigert.

## **4.4. Hemmung der lysosomalen Cathepsin-Proteasen**

### **4.4.1. Inhibition von CTSB und CTSL in der akuten DSS-Colitis**

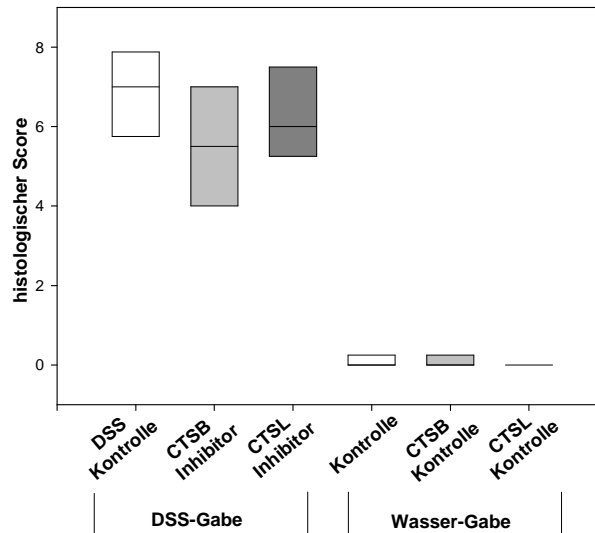
In Vorarbeiten der Arbeitsgruppe konnte gezeigt werden, dass es in intestinalen Makrophagen, die aus entzündeten Bereichen der Mukosa isoliert wurden, zu einer erhöhten Expression der Cathepsine B, D und L kommt (40;146). Die Inhibition von CTSD bzw. die gemeinsame Inhibition von CTSB und CTSL führte zu einer deutlichen Besserung der Symptome im Modell der akuten DSS-Colitis (146). Aufgrund dieser Daten sollte in dieser Arbeit der Effekt der separaten Inhibition von CTSB und CTSL untersucht werden, um zu klären welches das effektivere CTS ist.

Der Versuchsablauf entsprach dem des bereits durchgeführten Experiments von Menzel (146). Verwendet wurden Balb/c Mäuse und die akute Colitis wurde durch DSS im Trinkwasser induziert (3.13.1). Die verwendeten spezifischen Inhibitoren und deren optimale Dosierung wurden Publikationen entnommen. Als spezifischer Inhibitor von CTSB diente L-trans-Epoxy succinyl-Ile-Pro-OH-Propylamid (CA-074). Die Aktivität von CTSL wurde spezifisch durch den Inhibitor Z-Phe-Tyr-Aldehyd blockiert (98;98;154-156). Beide Inhibitoren sind nicht in der Lage die Zellmembran zu passieren, so dass sie nur die extrazelluläre Aktivität der Cathepsine inhibieren. Die Inhibitoren der zwei zu untersuchenden CTS wurden intraperitoneal appliziert (3.13.2). Um eventuell toxische Effekte der CTS-Inhibitoren auszuschließen, wurden diese auch gesunden Mäusen über die Dauer des Versuches verabreicht.

#### **4.4.1.1. Einfluss der CTS-Inhibition auf die Histologie**

Die Inhibition von CTSB bzw. CTSL bewirkte nur eine leichte Verbesserung des histologischen Scores, wobei die CTSB-Inhibition effizienter war (Mittelwert (MW) =5,5) verglichen mit der CTSL-Inhibition (MW=6,25). Der MW der Kontrollgruppe war 6,9. Die Applikation in gesunden Mäusen zeigte,

dass die Inhibitoren keinen negativen Einfluss auf diesen Parameter haben (Abb. 4.16).

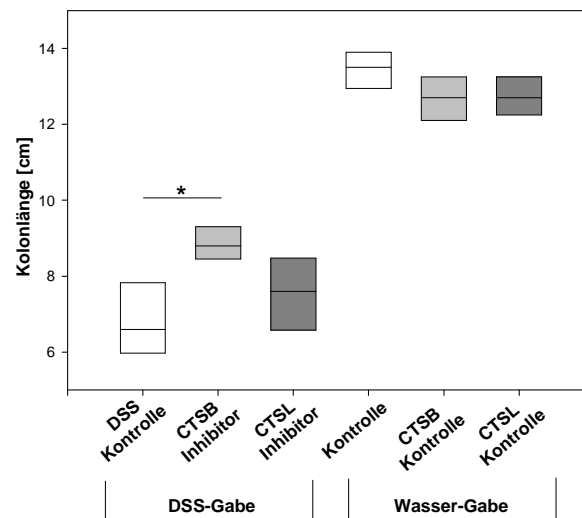


**Abb. 4.16: Histologie bei der CTS-Inhibition.**

Die Applikation der Inhibitoren führte zu einer leichten Besserung des histologischen Scores. Die Inhibition von CTSB mit CA-074 war etwas effektiver als die CTSL-Inhibition mit Z-Phe-Tyr-Aldehyd. Die Inhibitoren zeigten keinen negativen Effekt bei den unbehandelten Mäusen (n=5).

#### 4.4.1.2. Einfluss der CTS-Inhibition auf die Kolonlänge

Im Verlauf der Colitis kam es zu der typischen Reduktion der Kolonlänge und einer Verdickung der Darmwand bei allen Tieren, die DSS erhielten. Die Kolonverkürzung war jedoch in den Gruppen mit Inhibitoren nicht so stark ausgeprägt. Die Inhibition von CTSB bewirkte eine signifikante Verbesserung der Kolonlänge um 30%. In den gesunden Gruppen waren kaum Unterschiede zu erkennen, so dass die Inhibitoren auch auf diesem Parameter keinen negativen Effekt zeigten (Abb. 4.17).



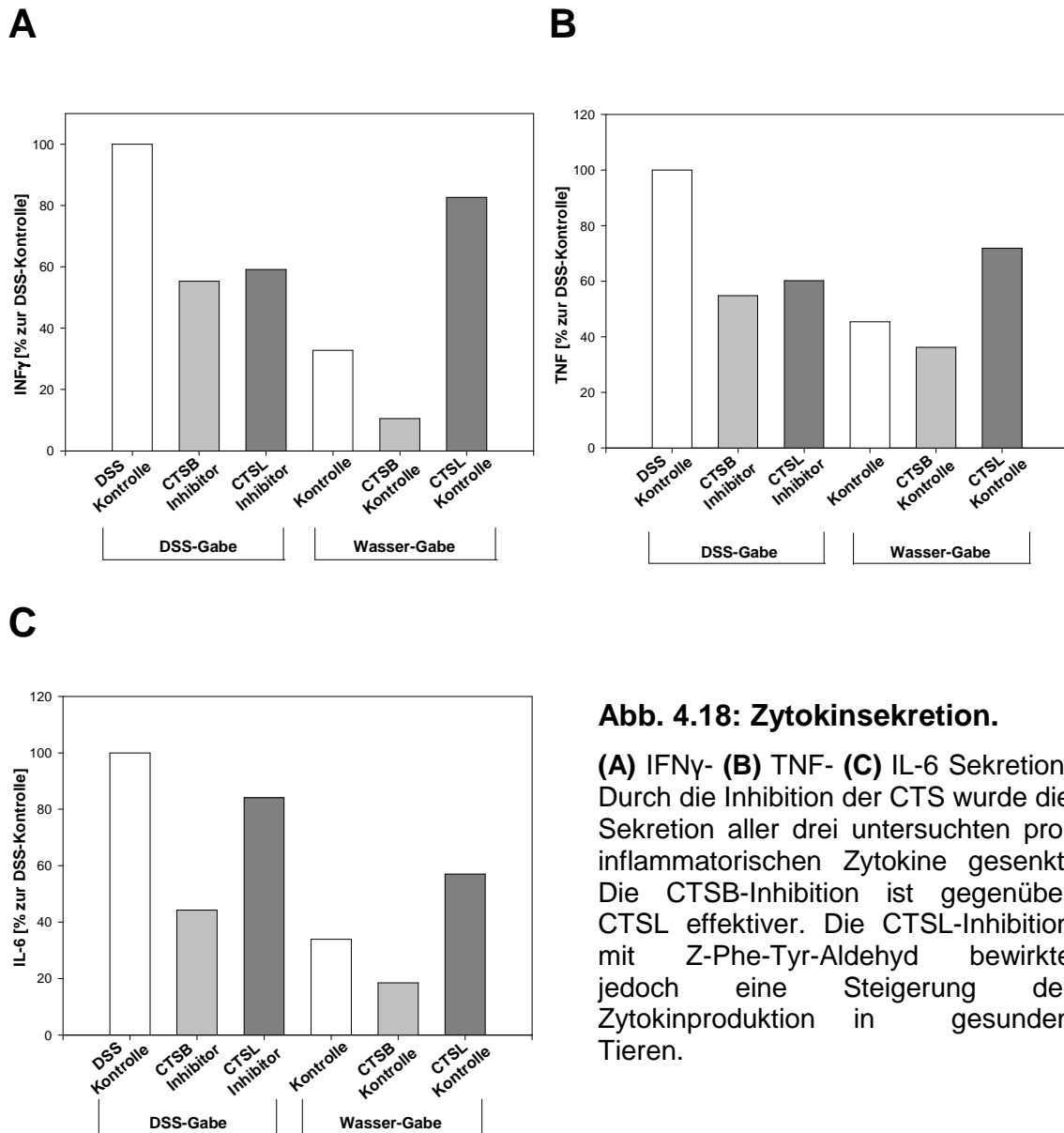
**Abb. 4.17: Kolonlänge bei der CTS-Inhibition.**

Durch die Inhibition der CTS waren die Därme weniger verkürzt. Die CTSB-Inhibition mit CA-074 bewirkte eine signifikante Besserung um 30% (\*  $p < 0,005$ ). Die Applikation beider Inhibitoren zeigte keine negativen Effekte auf die Kolonlänge.

#### 4.4.1.3. Einfluss der CTS-Inhibition auf die Zytokinsekretion

Um den Status des intestinalen Immunsystems evaluieren zu können, wurde die Zytokinsekretion der mesenterialen Lymphknotenzellen bestimmt. Die Auswertung ergab, dass durch die Inhibition der CTS die Sekretion aller untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine (IFN $\gamma$ , TNF und IL-6) im Vergleich zu den Kontrollen gesenkt werden konnte. Die Inhibition von CTSB war im Falle von IFN $\gamma$  und TNF nur leicht, bei IL-6 jedoch deutlich effektiver gegenüber der CTSL-Inhibition. Darüber hinaus bewirkte der CTSL-Inhibitor eine Steigerung aller untersuchten Zytokine in den gesunden Tieren. Beim CTSB-Inhibitor wurde dieser Effekt nicht beobachtet (Abb. 4.18).





**Abb. 4.18: Zytokinsekretion.**

**(A) IFN $\gamma$ - (B) TNF- (C) IL-6 Sekretion:** Durch die Inhibition der CTS wurde die Sekretion aller drei untersuchten pro-inflammatorischen Zytokine gesenkt. Die CTSL-Inhibition ist gegenüber CTSL effektiver. Die CTSL-Inhibition mit Z-Phe-Tyr-Aldehyd bewirkte jedoch eine Steigerung der Zytokinproduktion in gesunden Tieren.

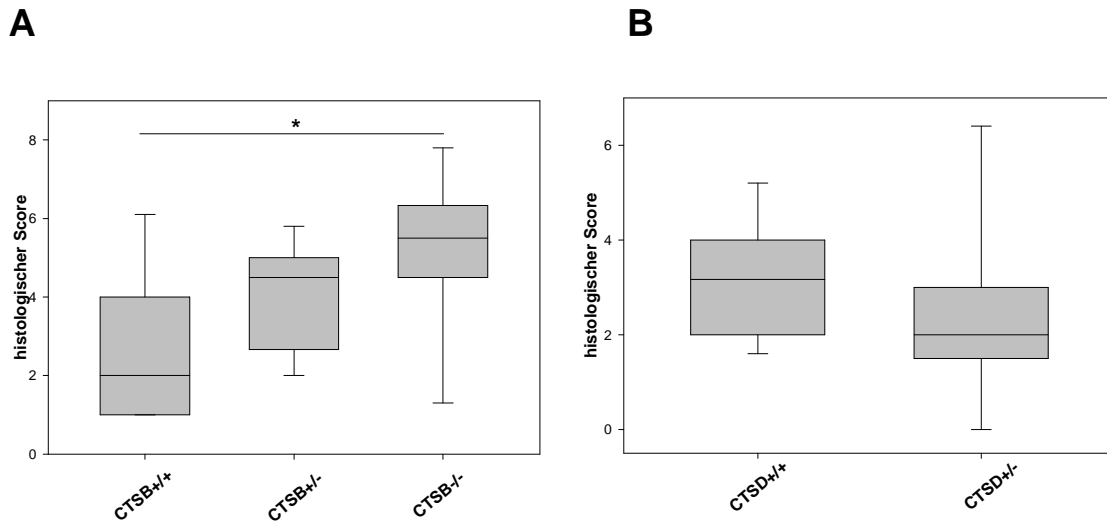
Zusammenfassend kann man sagen, dass die Applikation der CTS-Inhibitoren eine Besserung aller Parameter bezüglich der akuten DSS-Colitis bewirkte. Die Inhibition von CTSL im Vergleich zu CTSL stellte sich dabei als effizienter dar. In gesunden Tieren hatten die Inhibitoren keinen Einfluss auf den histologischen Score und die Kolonlänge, jedoch resultierte die Gabe des CTSL-Inhibitors in einer erhöhten Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , TNF und IL-6. Dieser negative Effekt war mit dem CTSL-Inhibitor nicht zu beobachten.

#### **4.4.2. Einfluss des CTSB bzw. CTSD Knock-outs auf die chronische DSS-Colitis**

Aufgrund dieser Daten und dem oben erwähnten Vorexperiment sollte die Inhibition von CTSD bzw. CTSB in der chronischen DSS-Colitis untersucht werden. Dafür wurden Knock-out (K.o.) Mäuse gezüchtet und genotypisiert (3.2; 3.13.). Verwendet wurden sowohl die Wildtypen, die heterozygoten und homozygoten K.o.-Tiere. Im Falle von CTSD erhielt man keine homozygoten Knock-outs, da dieser Genotyp spätestens 26 Tage nach der Geburt letal ist. Die chronische Colitis wurde durch vier Zyklen DSS induziert. Sechs Wochen nach der letzten DSS-Gabe hatte sich die chronische Colitis manifestiert und der Versuch wurde beendet (3.13).

##### **4.4.2.1. Histologie**

Im Falle von CTSB kam es zu einer Verschlimmerung des histologischen Scores mit zunehmendem K.o. Der Score in der Gruppe mit den homozygoten Knock-outs war fast doppelt so hoch wie der in der Wildtypgruppe. Bei CTSD war ein gegenteiliger Effekt zu beobachten. Der heterozygote K.o. bewirkte eine leichte Verbesserung des histologischen Scores verglichen mit den Wildtyp-Mäusen (Abb. 4.19).

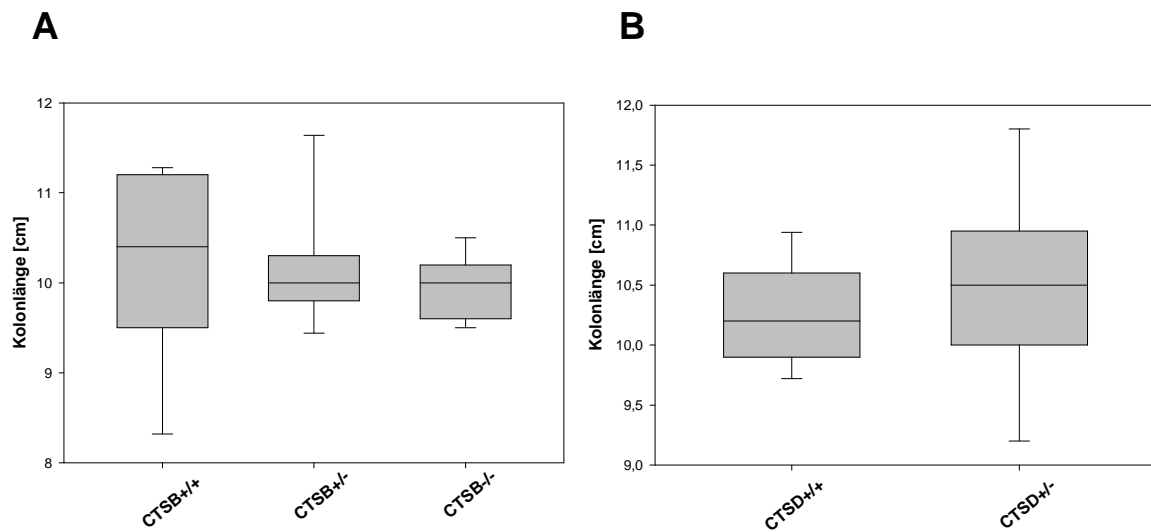


**Abb. 4.19: Histologischer Score.**

**(A)** Im Falle von CTSB bewirkte der K.o. eine Verschlechterung des histologischen Scores. Der Score des homozygoten K.o. war fast doppelt so hoch wie bei den Wildtypmäusen (\*  $p < 0,01$ ). **(B)** Bei CTSD kam es durch den K.o. zu einer leichten Besserung des histologischen Scores ( $n=11$ , außer bei CTSD<sup>+/-</sup>  $n=13$ ).

#### 4.4.2.2. Kolonlängen

Bei der Auswertung der Kolonlängen ließ sich die gleiche Beobachtung machen wie bereits beim histologischen Score. Bei CTSB war das Kolon der Wildtypen etwas länger als das von den K.o.-Tieren. Bei CTSD waren die Därme durch den K.o. etwas weniger verkürzt (Abb. 4.20).

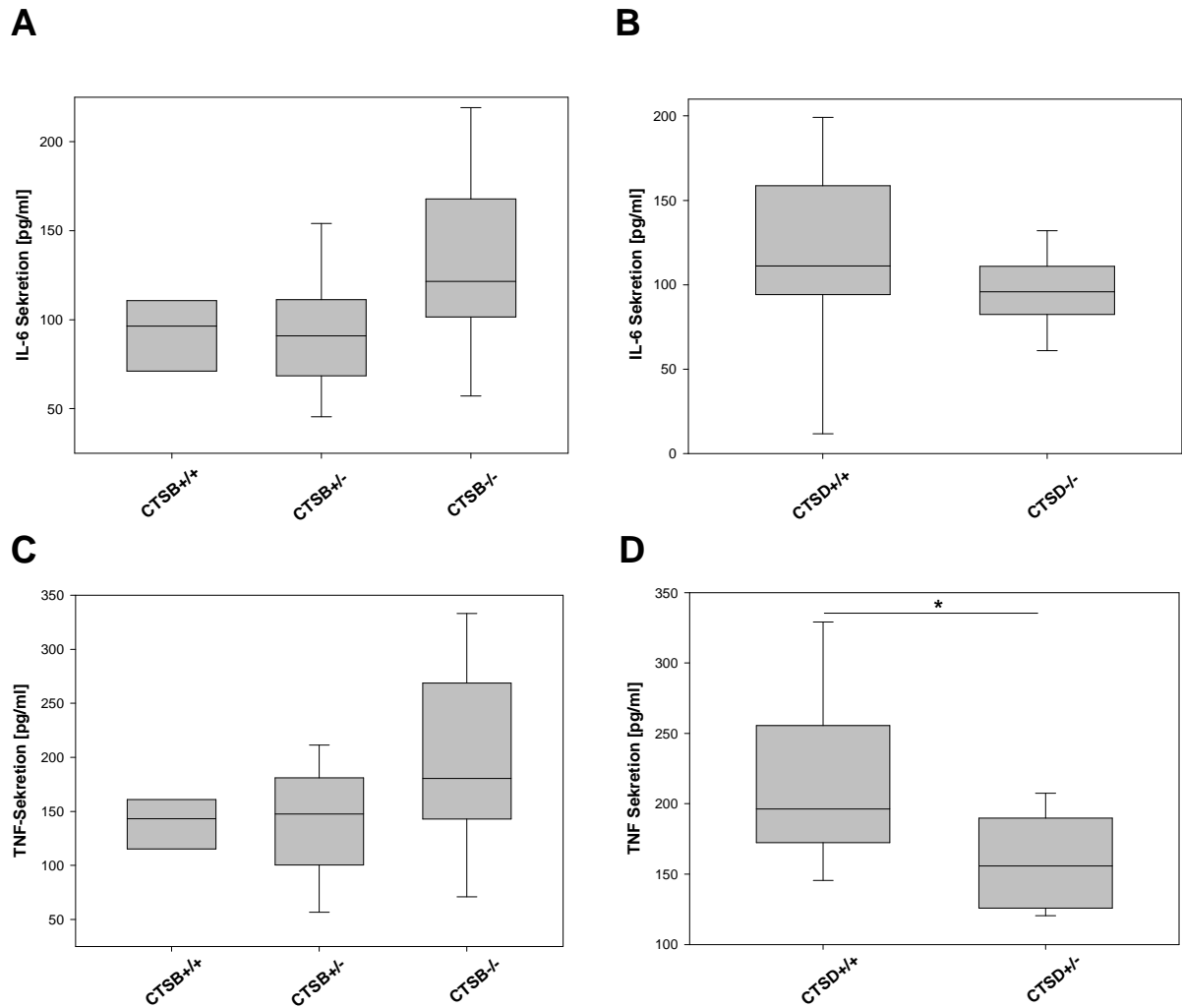


**Abb. 4.20: Kolonlängen.**

**(A)** Bei den CTSB-K.o. Mäusen kam es zu einer minimal stärkeren Reduktion der Kolonlängen im Vergleich zu den Kontrollen. **(B)** Bei CTSD hingegen zu einer leichten Besserung.

#### 4.4.2.3. Zytokinsekretion

Durch den CTSB K.o. lässt sich ein leichter Anstieg der proinflammatorischen Zytokine TNF und IL-6 im Vergleich zum Wildtyp beobachten. Im Gegensatz dazu konnte durch den CTSD K.o. ein leichter Rückgang der IL-6 Sekretion und eine signifikante Reduktion von TNF erreicht werden (Abb. 4.21).



**Abb. 4.21: Zytokinsekretion.**

Der K.o. von CTSB führte zu einem leichten Anstieg der IL-6 Sekretion **(A)**, wohingegen der K.o. von CTSD eine leichte Reduktion bewirkte **(B)**. Durch den CTSB-K.o. kam es zu einem leichten Anstieg von TNF **(C)**. Der CTSD-K.o. bewirkte eine signifikante Reduktion von TNF (\* p=0,02) **(D)**.

Durch das K.o. Experiment konnte gezeigt werden, dass das Stilllegen des CTSB Gens eine Verschlechterung der hier untersuchten Colitisparameter bewirkte. Besonders deutlich war dieser Effekt anhand des histologischen Scores zu beobachten. Im Gegensatz dazu konnte durch den K.o. von CTSD eine leichte Verbesserung der Parameter erreicht werden. Vor allem die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins TNF wurde im Vergleich zum Wildtyp reduziert.

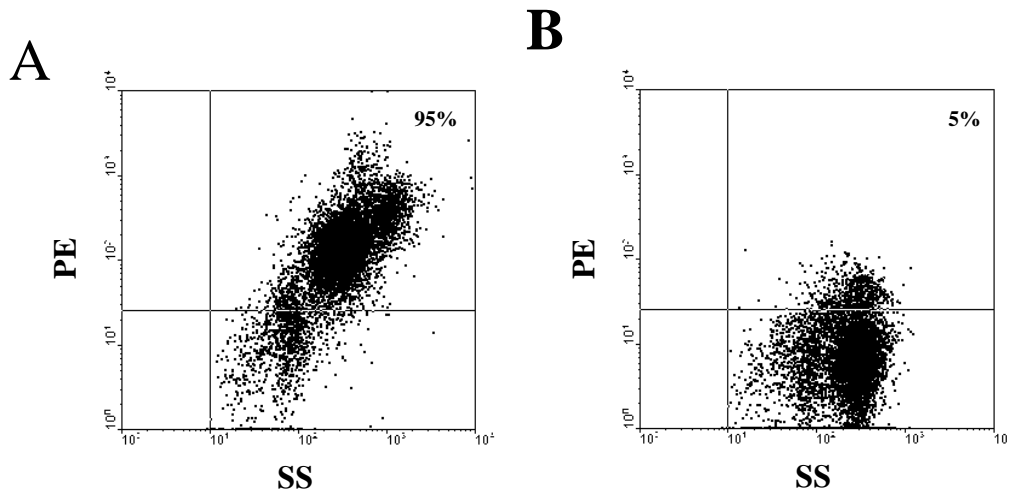
#### **4.5. Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF- $\kappa$ B in IMAC**

Intestinale Makrophagen (IMAC) besitzen einen spezifischen Phänotyp, der die typischen Oberflächenantigene der Monozyten nicht aufweist (1.3.1.3). Studien über den Phänotyp und die Funktion von IMAC wurden in unserer Arbeitsgruppe zwar vorangetrieben (38-40), aber dennoch konnten noch nicht alle wichtigen Zusammenhänge eindeutig geklärt werden. Ziel war es daher Monozyten und IMAC aus Kontroll- und CED-Patienten funktionell besser zu charakterisieren und die Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF- $\kappa$ B zu untersuchen.

##### **4.5.1. Aufreinigung intestinaler Makrophagen**

Die selektive Isolierung von IMAC über CD33 als geeigneten Oberflächenmarker wurde in der Arbeitsgruppe bereits vor einiger Zeit etabliert (37). Dennoch sollte die Aufreinigung nach dem etablierten Protokoll nachvollzogen, und die Reinheit der IMAC durchflusszytometrisch kontrolliert werden, da für die Expressionsanalysen RNA einer reinen Makrophagenpopulation benötigt wurde.

Nach zwei Isolationsschritten zeigte die Fluoreszenzemission von PE-markierten CD33-positiven Zellen eine Anreicherung der IMAC auf 95% der intakten Zellen (Abb. 4.22 A). Eine unspezifische Färbung wurde durch die Isotypenkontrolle ausgeschlossen (Abb. 4.22 B).



**Abb. 4.22: Isolierung humaner intestinaler Makrophagen.**

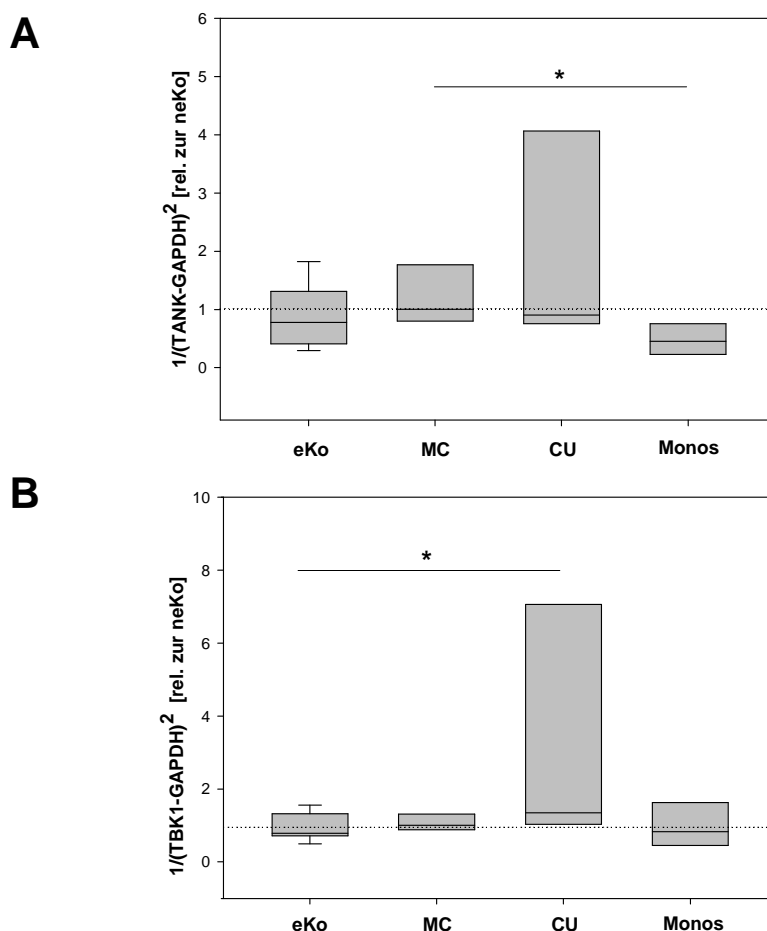
Aufreinigung intestinaler Makrophagen (IMAC) durch anti-CD33 MicroBeads. **(A)** Seitwärtsstreulicht (SS)- und R-Phycoerythrin (PE)-Charakteristika der CD33 positiven Zellen. Nach zwei Isolationsschritten betrug die Reinheit 95%. **(B)** Die Isotypenkontrolle zeigte keine unspezifische Färbung.

#### 4.5.2. Expression von TANK und TBK1

NF- $\kappa$ B liegt in IMAC in gebundener und somit in inaktiver Form im Zytoplasma vor, so dass es nicht zur Aktivierung NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene kommt. Dies kann unter anderem an TANK liegen (1.3.3.1). In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte durch subtraktive Hybridisierung eine Induktion von TANK in IMAC gegenüber *in vitro* differenzierten Makrophagen festgestellt werden (39). Zudem haben erste Untersuchungen mittels Affymetrix GeneChip-Analysen in unserer Arbeitsgruppe gezeigt, dass TANK in IMAC gegenüber *in vitro* differenzierten Makrophagen etwas höher und TBK1, welches die Inaktivierung durch TANK wieder aufhebt, signifikant geringer exprimiert wird (nicht veröffentlicht). Die Tatsache, dass TANK die NF- $\kappa$ B-Aktivierung inhibiert und die Tatsache, dass NF- $\kappa$ B in Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa

nicht aktiviert ist, ließ den Schluss zu, dass TANK bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert wird.

Um dies zu prüfen wurden IMAC von Kontroll- und CED-Patienten, sowie Monozyten isoliert (3.1.1) und deren cDNA gewonnen (3.6). Die Quantifizierung der Genexpression von TANK und TBK1 erfolgte anschließend mittels Real-Time-PCR (TaqMan® (3.7)). Für die Auswertung wurde der Mittelwert der Expression von den nicht entzündeten Kontrollen (neKo) von den erhaltenen Expressionswerten aller Proben subtrahiert.



**Abb. 4.23: Genexpression in IMAC und Monozyten.**

**(A)** Expression von TANK. Diese entsprach in entzündeten Kontrollen (eKo) in etwa der in den neKo (MW=0,9). In IMAC von CED-Patienten (MC 1,3-fach; CU 2,1-fach) war TANK sogar induziert, wohingegen es in Monozyten (Monos) deutlich weniger exprimiert wird (MW=0,55). **(B)** Expression von TBK1. In IMAC von eKo und MC-Patienten, sowie in Monos entspricht die TBK1-Expression in etwa den neKo. In CU-Patienten war TBK1 3,5-fach induziert (neKo; n=8; eKo n=12; MC n=6; CU n=5; Monos n=7; \* p<0,05).

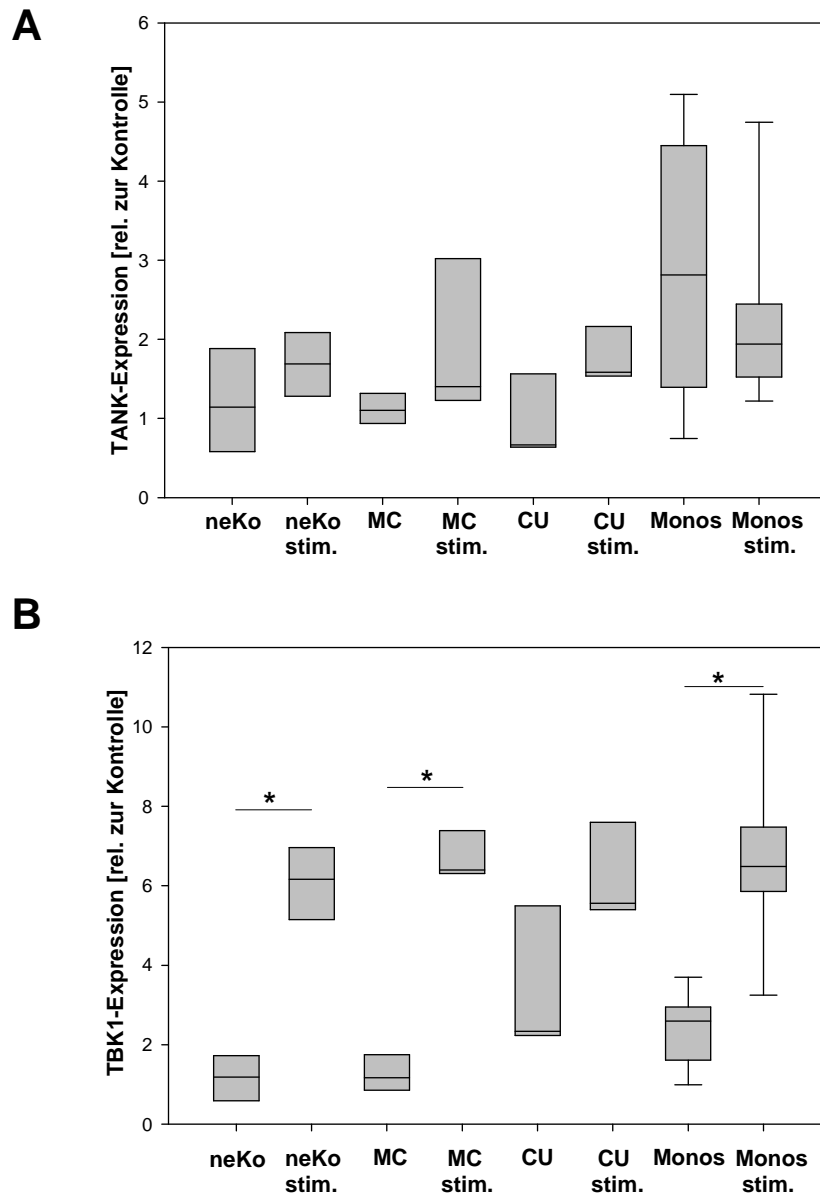


Wie die Abbildung 4.23 A zeigt, war die Expression von TANK in IMAC tatsächlich höher als in Monozyten. Innerhalb der IMAC-Gruppen war die TANK Expression in IMAC von CED-Patienten am höchsten. Die Analyse von TBK1 ergab, dass die Expression in entzündeten Kontrollen (eKo), in IMAC von MC-Patienten und in Monozyten (Monos) in etwa der Expression in neKo entsprach. In IMAC von CU-Patienten war TBK1 jedoch 3,5fach erhöht (Abb.4.23 B).

#### **4.5.3. Expressionsunterschiede von TANK und TBK1 nach TNF-Stimulation**

Pomerantz und Baltimore gelang es nachzuweisen, dass TANK im TNF-vermittelten Signalweg ausschließlich eine inhibitorische Rolle spielt. Die beobachtete stimulierende Aktivität ist auf TBK1 zurückzuführen. Nach Bindung eines Liganden an den Rezeptor wird TBK1 an den schon bestehenden inaktiven Komplex aus TANK und TRAF2 rekrutiert und es entsteht ein aktiver tertiärer Komplex, der in die NIK-IKK-Kaskade mündet (86). Es sollte geklärt werden, ob es nach Stimulation mit TNF zu einem veränderten Expressionsmuster von TANK und TBK1 kommt. Dazu wurden wie bereits unter 4.5.2 beschrieben Monozyten und IMAC isoliert und mit 100ng/ml TNF für 20h stimuliert bzw. mit Medium inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit RLT-Puffer lysiert, um cDNA zu gewinnen. Die Quantifizierung wurde erneut mittels Real-Time-PCR (TaqMan<sup>®</sup>) durchgeführt und von den erhaltenen Expressionswerten der Mittelwert von den unstimulierten Kontrollen subtrahiert.

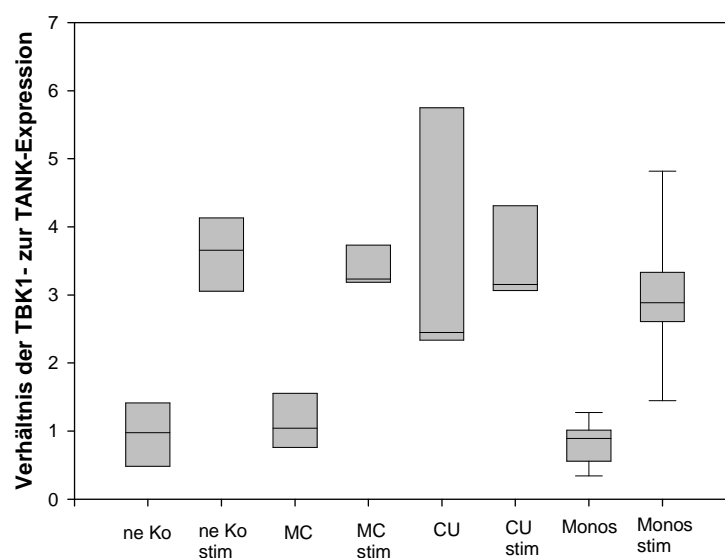
Es stellte sich heraus, dass es durch die Stimulation mit TNF in allen IMAC zu einer leichten Induktion von TANK gegenüber der unstimulierten Probe kam. In Monozyten wurde TANK jedoch weniger exprimiert im Vergleich zu den nicht stimulierten Zellen (Abb. 4.24 A). TBK1 hingegen wurde durch die Stimulation mit TNF sowohl in den IMAC als auch den Monozyten induziert. Die Unterschiede waren, bis auf die CU-Gruppe, signifikant (Abb. 4. 24 B).



**Abb. 4.24: Expressionsunterschiede nach TNF-Stimulation.**

**(A)** Expression von TANK. Nach TNF-Stimulation kam es zu einer leicht erhöhten Expression von TANK in IMAC, jedoch zu einer reduzierten Expression von TANK in Monozyten. **(B)** TBK1-Expression. Sowohl in Monozyten als auch IMAC von Kontrollen und MC kam es zu einer signifikanten Induktion von TBK1 nach TNF-Stimulation (neKo n=5; MC n=5; CU n=3; Monos n= 13; \* p<0,001).

Da man davon ausgeht, dass TANK inhibierend und TBK1 aktivierend auf den NF- $\kappa$ B-Signalweg wirken, wurde das Verhältnis beider Proteine bestimmt. Das Verhältnis der TBK1-Expression zur TANK-Expression ist in den unstimulierten Proben (mit Ausnahme der CU) gleich. Es zeigte sich jedoch, dass TBK1 nach TNF-Stimulation deutlich stärker induziert wird als TANK (Abb. 4.25). Aufgrund dieser Daten müsste der NF- $\kappa$ B-Signalweg sowohl in Monozyten als auch in IMAC ähnlich aktiviert werden.



**Abb. 4.25: Verhältnis der TBK1- zur TANK-Expression.**

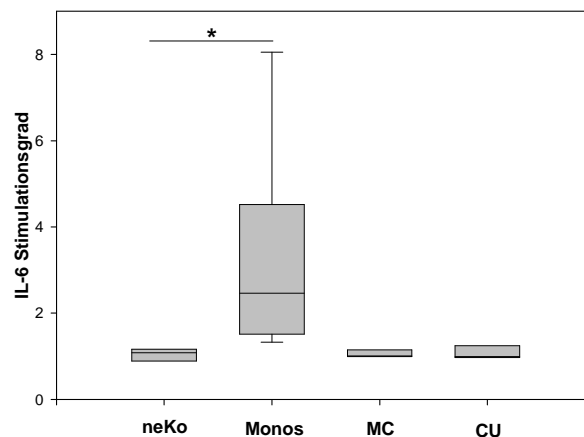
Das Verhältnis der TBK1- zur TANK-Expression ist in den unstimulierten Proben (mit Ausnahme von CU) gleich. Nach Stimulation mit TNF ist die Expression von TBK1 deutlich höher als die von TANK.

#### 4.5.4. IL-6 Sekretionsunterschiede in IMAC und Monozyten

Aufgrund des, bereits unter 1.3.1.3 beschriebenen, unterschiedlichen Expressionsmuster sind IMAC reaktionsträger als andere Makrophagen, was für ihre Funktion im intestinalen Immunsystem wichtig ist. Die Auswertung des Expressionsverhältnisses von TBK1 zu TANK nach Stimulation mit TNF deutet jedoch daraufhin, dass Monozyten, die einen sehr reaktiven Zelltyp darstellen und IMAC etwa gleich reaktiv sein müssten (Abb. 4.25).

Um diese Frage zu klären wurden IMAC aus Kontroll- und CED-Patienten bzw. Monozyten für 20h mit TNF stimuliert (siehe 4.5.3) und anschließend die IL-6 Konzentration mittels ELISA bestimmt. Die Stimulation mit TNF führt über TRAF2 zur Aktivierung von NF- $\kappa$ B und folglich zur IL-6 Sekretion. Ein unterschiedliches IL-6 Sekretionsverhalten gibt somit Aufschluss über die Reaktivität der untersuchten Zellen.

Wie die Abb. 4.26 zeigt, haben Monozyten mit einem deutlichen Anstieg von IL-6 auf die Stimulation mit TNF reagiert. Die IMAC hingegen ließen sich durch TNF nicht stimulieren. Diese Beobachtungen gehen mit den TANK-Expressionsdaten einher (Abb. 4.24 A).

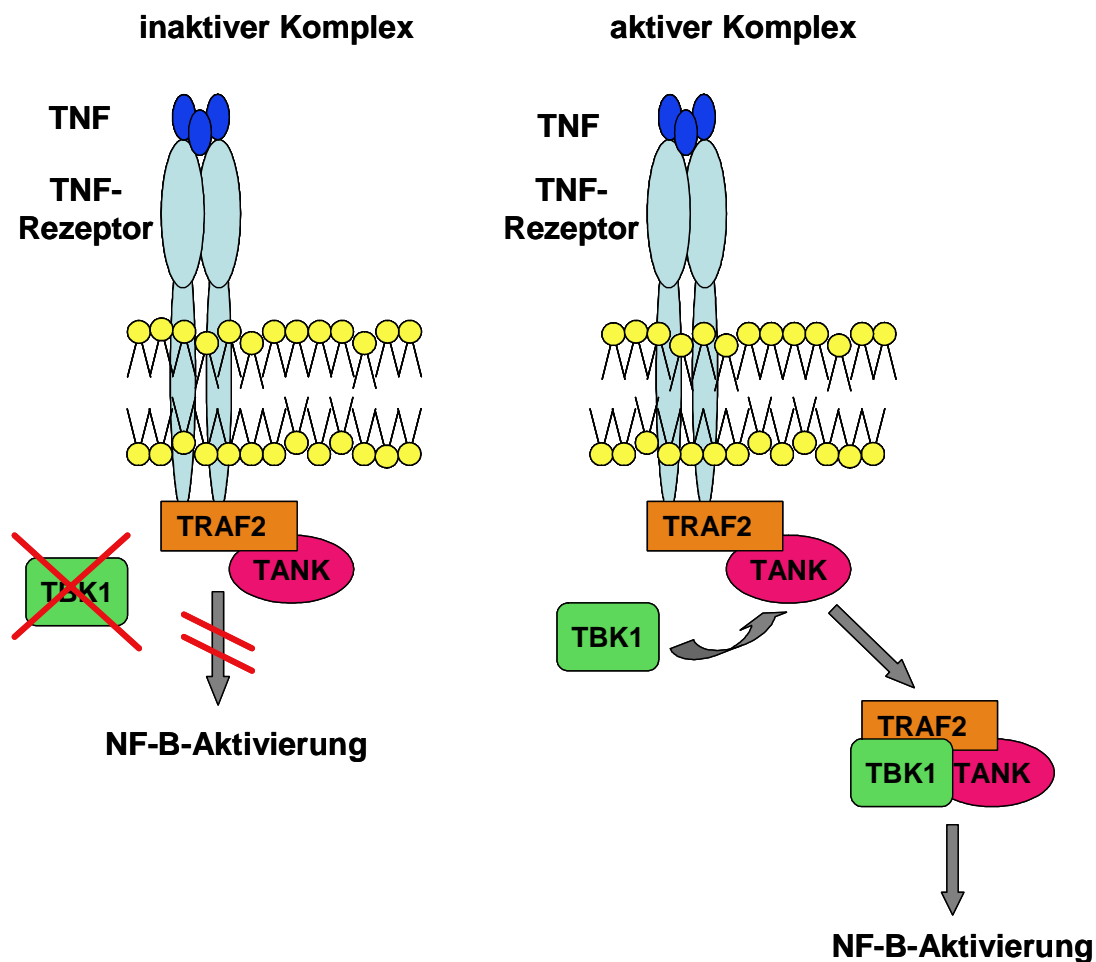


**Abb. 4.26: IL-6 Sekretion in IMAC und Monozyten.**

Durch Stimulation mit TNF kam es zu keiner erhöhten IL-6 Sekretion in IMAC. Im Gegensatz dazu ließen sich Monozyten mit TNF stimulieren, was zu einer erhöhten IL-6 Produktion führte (neKo n=7; Monos n=11; MC n=7; CU n=4; \* p< 0,05).

Die Expressionsanalysen von TANK in IMAC und Monozyten haben gezeigt, dass TANK nach Stimulation mit TNF in IMAC stärker und in Monozyten niedriger exprimiert wird. Da TANK durch Binden an TRAF2 die Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibiert (Abb. 4.27), könnte eine Induktion von TANK sich auch in einer reduzierten Stimulierbarkeit widerspiegeln. Diese Überlegung wurde durch das Experiment in 4.5.4 bestätigt. Die TNF-Stimulation bewirkte nur in Monozyten eine gesteigerte IL-6 Sekretion, was mit der gemessenen, reduzierten TANK-Expression einhergeht. Die Stimulation der IMAC mit TNF

bewirkte hingegen keine gesteigerte IL-6 Produktion. Auch diese Beobachtung stimmt mit den TANK-Expressionsdaten überein. Die stärkere Induktion der TBK1 Expression gegenüber TANK hat keinen Einfluss auf die Reaktivität der Zellen.



**Abb. 4.27: Schema für das Zusammenwirken von TANK und TBK1 bei der Aktivierung von NF-κB (adaptiert nach (26)).**

In Abwesenheit von TBK1 liegt TANK an TRAF2 gebunden vor und es kommt, trotz Ligandenbindung an den Rezeptor, nicht zur Signalweiterleitung und zur Aktivierung von NF-κB. Diese Situation liegt in IMAC vor. Bei Expression von TBK1 kommt es nach Ligandenbindung an den Rezeptor zur Bildung eines aktiven tertiären Komplexes aus TANK/TRAF2/TBK1 und zur Aktivierung von NF-κB.

## 5. Diskussion

Charakteristisch für chronisch entzündliche Darmerkrankungen (CED) wie Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU) sind immer wiederkehrende Entzündungen, die mit Gewebeerstörungen einhergehen (157). Bis heute sind die Therapiemöglichkeiten von CED-Patienten noch unbefriedigend. Die Patienten werden häufig während eines akuten Schubes mit Steroiden behandelt, um die Entzündung zu stoppen. Anschließend wird versucht, die Remission durch Immunsuppressiva aufrechtzuerhalten. Die Anwendung beider Wirkstoffgruppen geht jedoch mit relevanten Nebenwirkungen einher und auch die Anwendung innovativerer Medikamente wie den *Biologicals* ist nicht unbedenklich. Im Rahmen dieser Dissertation sollten daher Voruntersuchungen für potentielle neue Therapien durchgeführt werden.

### 5.1. Einfluss von gHB und AC bei der experimentellen Colitis

Der Schwerpunkt der Experimente in dieser Arbeit war auf die getrockneten Heidelbeeren (gHB) und deren Pflanzenfarbstoffe, die Anthocyane (AC) gerichtet. Für beide natürlich vorkommenden Substanzen konnten bereits verschiedene positive Effekte nachgewiesen werden, weshalb sie für die Behandlung von CED-Patienten in Frage kommen könnten (1.4.2). Aufgrund dieser Vordaten und der Tatsache, dass es sich um natürlich vorkommende Substanzen handelt, die aufgrund ihrer Unbedenklichkeit auch als Farbstoffe in der Lebensmittelchemie eingesetzt werden, wurden die gHB und deren AC im Modell der experimentellen DSS-Colitis getestet.

Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von gHB bzw. AC zu einer Besserung der in dieser Arbeit untersuchten Parameter bei der induzierten Colitis führten. Um deren Wirkung zu untersuchen, wurden Mäuse zunächst mit 20% gHB und 10% AC-Extrakt gefüttert und dann eine akute bzw. chronische DSS-Colitis induziert. Bei der akuten Colitis konnte eine deutlich geringere Kolonverkürzung und eine starke Abnahme der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und TNF in Mäusen beobachtet werden, die

mit gHB gefüttert wurden. Dem gegenüber war im Falle der chronischen Colitis nur eine Inhibierung der Kolonverkürzung, jedoch keine Wirkung auf die pro-inflammatorische Zytokine IFN $\gamma$  und IL-6 nachzuweisen. Die Fütterung der Mäuse mit AC führte sowohl in der akuten als auch der chronischen Colitis zu einer Besserung der Entzündung, was sich in einer Normalisierung der Kolonlänge, einem verbesserten histologischen Score und einer Reduktion der Zytokine IFN $\gamma$ , TNF und IL-6 widerspiegelte. Die Fütterung von 10% AC war sehr effektiv zur Linderung der Colitissymptome, allerdings bekamen die Mäuse eine leicht lilafarbene Haut und Urin und Faeces färbten sich rot-violett. Die Fütterung der geringeren AC-Konzentration von 1% erwies sich als vergleichbar effektiv wie die 10% AC-Konzentration hinsichtlich der Normalisierung der Kolonlänge und der Verbesserung des histologischen Scores sowohl in der akuten als auch der chronischen DSS-Colitis. Die geringere Konzentration bewirkte zudem eine Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$  und IL-6 in der chronischen Colitis, hatte jedoch keinen Einfluss auf die Sekretion von IFN $\gamma$  und TNF in der akuten Colitis. Darüber hinaus wurde auch 0,1% AC-haltiges Futter untersucht. In diesen geringen Dosierungen konnte jedoch keine Besserung der untersuchten Colitisparameter, weder in der akuten noch in der chronischen DSS-Colitis, erreicht werden (Daten nicht gezeigt).

Heidelbeeren bestehen zu circa 10% aus Gerbstoffen, welche adstringierende Eigenschaften besitzen. Die Gerbstoffe reagieren mit Proteinen der Haut, die sich daraufhin zusammenzieht und austrocknet, wodurch das Austreten von Flüssigkeiten verringert und Krankheitserregern der Nährboden entzogen wird. Diese Wirkung wird auch bei Schleimhäuten genutzt. Bei innerlicher Anwendung im Magen-Darm-Trakt kommt es zu einer oberflächlichen Verdichtung der erkrankten Darmschleimhaut, so dass weniger Wasser in den Darm abgegeben wird (158). Eine Pilotstudie mit MC-Patienten hat gezeigt, dass eine Kombination aus Gerbstoffen und Ethacridinlactat (einem Antiseptikum) eine Besserung der Symptome bewirkte, was sich in einer deutlich geringeren Stuhlfrequenz widerspiegelte (159). Des Weiteren wurde ihre Wirkung schon bei Reisediarrhöen bestätigt (160). Aufgrund dessen könnten Gerbstoffe die entscheidende Komponente sein, die für den positiven

Effekt verantwortlich ist, der bei den mit gHB gefütterten Mäusen zu beobachten war. Die Gerbstoffkonzentration im AC-Extrakt beträgt allerdings nur 3%, dennoch waren die AC deutlich effektiver als die gHB, deren Gerbstoffgehalt etwa 10% beträgt. Folglich sind die Gerbstoffe nicht die entscheidende Komponente im AC-Extrakt.

Ein weiterer häufig diskutierter Nahrungsbestandteil bei der Ernährung von MC-Patienten sind die Ballaststoffe. Eine Studie von 1991 beobachtete eine Linderung der Symptome bei Patienten mit CU durch eine Ballaststoffreiche Ernährung (161). Anaerobe Bakterien fermentieren Ballaststoffe zu kurzkettigen Fettsäuren, denen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung des Gleichgewichts im Darm zugeschrieben wird (162). Das Potential der Ballaststoffe bei der Behandlung von CED-Patienten konnte darüber hinaus in verschiedenen Studien bestätigt werden. So führte ihre Fütterung an Ratten zu einer deutlichen Besserung der Entzündung in gut etablierten Colitis-Modellen, die ähnlich den humanen CED sind (163-166). Die Konzentration der Ballaststoffe im Futter vermischt mit 10% AC ist jedoch nur etwa 0,4% höher als im Normalfutter, so dass der lindernde Effekt der AC höchstwahrscheinlich nicht auf die Ballaststoffe zurückzuführen ist.

Jede Beersorte hat ein bestimmtes AC-Profil, so dass auch die lindernde Wirkung anderer Beeren, wie Kirschen und Preiselbeeren, sowie von AC anderer Beeren bei der Behandlung von Colitis möglich ist. Neuere Studien haben signifikante Unterschiede zwischen verschiedenen Beeren hinsichtlich ihres anti-oxidativen Potentials bzw. ihres Einflusses auf das Wachstum von Krebszelllinien gezeigt (167-170). So beobachteten Boivin und seine Mitarbeiter eine starke Hemmung der Zellproliferation in verschiedenen Krebszelllinien durch Preiselbeeren und niedrigbuschige Heidelbeeren, während Erdbeeren und hochwachsende Heidelbeeren keinen Effekt hatten (167). Weiterhin wurde in einer Studie von 2000 mit weiblichen Probanden nachgewiesen, dass Preiselbeeren höhere anti-oxidative Fähigkeiten besitzen als Heidelbeeren, obwohl letztere größere Mengen an phenolischen Verbindungen besitzen (169).



Die in dieser Arbeit verwendeten Tiermodelle stellen eine Kombination aus prophylaktischem und therapeutischem Ansatz dar. Aufgrund dessen sprechen die erhaltenen Daten dafür, dass gHB für die Behandlung von akuten Entzündungen geeignet sind, wohingegen sie für chronische Erkrankungen ungeeignet scheinen. Im Gegensatz dazu sind AC, die aus Heidelbeeren extrahiert wurden, sowohl für die Behandlung von akuten als auch von chronischen Colitiserkrankungen wirksam.

Ein Vergleich der Wirksamkeit der gHB und der AC mit anderen Tiermodellen zeigt, dass die Fütterung dieser Substanzen, gemessen am Grad der Verbesserung des histologischen Scores und auch der erreichten Normalisierung der Kolonlänge, sehr effektiv ist. Das pro-inflammatorische Zytokin TNF spielt bei CED eine zentrale Rolle. In Mukosabiopsien von CED-Patienten wurde eine erhöhte Expression von TNF nachgewiesen (55;171;172). Zudem konnte durch eine Neutralisierung von TNF im Transfermodell mit SCID-Mäusen die Entstehung einer Colitis verhindert werden (173). Die Hemmung von TNF mit einem monoklonalen Antikörper in der chronischen DSS-Colitis erreichte eine Verbesserung des histologischen Scores um 30-40%. Wie in dieser Arbeit gezeigt, bewirkte die Fütterung von gHB hingegen nur eine leichte Besserung des histologischen Scores in der chronischen DSS-Colitis. Mit 1% AC gelang jedoch eine Verbesserung des histologischen Scores um 29% und mit 10% AC sogar um 41%. Ein weiterer untersuchter Colitis-Parameter war die Kolonlänge. Durch TNF-Hemmung wurde erreicht, dass die Kolonlänge im Mittel 9% länger war als in der unbehandelten Gruppe. Die entzündungsbedingte Kolonverkürzung konnte durch die Fütterung von gHB und 1% AC um 15%, durch die 10%-ige AC-Konzentration sogar um 34% reduziert werden. Die Wirkung der AC ist hinsichtlich des histologischen Scores gleich und angesichts der Kolonlänge deutlich besser im Vergleich zur TNF-Hemmung. Die Wirkung der TNF-Hemmung wurde allerdings durch eine fünftägige Gabe des TNF-Antikörpers erreicht, wohingegen die AC während der gesamten Versuchsdauer verabreicht wurden (174). Auch mit anderen natürlich vorkommenden Polyphenolen wie dem Epigallocatechin-3-Gallat (EGCG) aus grünem Tee ist es gelungen die Colitis zu lindern. Bei C57/BL6 Mäusen wurde

durch Gabe von TNBS (Trinitrobenzoeschwefelsäure) eine Colitis induziert. Sofort nach Einsetzen der Colitis-Symptome wurden die Tiere zweimal täglich mit EGCG mittels intraperitonealer Applikation behandelt. Anhand des Scores, des Gewichtsverlaufes und der blutigen Diarrhöen wurde der Colitis-Verlauf beurteilt. Abboud und seine Mitarbeiter konnten einen deutlich milderen Verlauf der Colitis bei den mit EGCG-behandelten Mäusen feststellen (175). Allerdings hatte die Behandlung keinen Effekt auf die Zytokinkonzentration im Plasma, wohingegen in dieser Dissertation durch die Fütterung mit gHB bzw. AC ein deutlicher Rückgang der pro-inflammatorischen Zytokine TNF, IL-6 und IFN $\gamma$  erreicht wurde. Eine weitere natürlich vorkommende Substanz, deren Einfluss bereits bei der akuten DSS-Colitis untersucht wurde, ist Curcumin, der Wirkstoff des Gewürzes Kurkuma. Eine parallele Gabe von DSS und Curcumin bewirkte eine Besserung des histologischen Scores um 50% und im Mittel war die Kolonlänge der Curcumingruppe sogar um 60% länger im Vergleich zu den DSS-Tieren ohne Curcumin. Zudem wurde gezeigt, dass Curcumin in der Lage ist, die NF- $\kappa$ B-Aktivierung zu verhindern, so dass man von einem reduzierten Level der pro-inflammatorischen Zytokine ausging. Eine Messung der Zytokin-Konzentration wurde allerdings nicht gezeigt (176).

## **5.2. Einfluss von gHB und AC auf die Apoptose**

Es konnte gezeigt werden, dass die Fütterung von gHB und AC Apoptose in Epithelzellen von Kolongewebe deutlich reduziert. Dieser Effekt konnte nur in der chronischen, nicht jedoch in der akuten Colitis beobachtet werden. Im akuten Experiment erhielten die Mäuse DSS-haltiges Wasser bis zum Ende des Versuchs, so dass der toxische Einfluss des DSS bis zum Schluss eine Zerstörung des mukosalen Epithels (verstärkte Apoptose von Epithelzellen) bewirkte. Aufgrund dessen konnten keine einheitlichen Ergebnisse erhalten werden. In der chronischen DSS-Colitis wurden die Tiere erst vier Wochen nach der letzten DSS-Gabe getötet. In dieser Zeit verschwand die toxische Wirkung des DSS, die chronische Colitis manifestierte sich und der Effekt der zugefütterten Substanzen kam zum Tragen. Es stellte sich heraus,

dass 10% AC am effektivsten in der Verhinderung der Apoptose waren (68% weniger apoptotische Zellen), aber auch mit 1% AC konnte eine Reduktion um 44% erreicht werden. Von den getesteten Substanzen war der Effekt durch gHB am schwächsten, aber auch sie führten zu einem Rückgang der Apoptose um 35%.

Mit Hilfe des TUNEL-Assays lassen sich apoptotische Vorgänge nachweisen, allerdings ist die Methode nicht spezifisch, da auch bestimmte Phasen des nekrotischen Zelltodes angefärbt werden. Eine Apoptose-spezifische Methode wäre der Nachweis der Kinase Caspase-3. In dieser Arbeit ist eine immunhistochemische Färbung des Kolongewebes auf Caspase-3 nicht gelungen. Da jedoch bei allen angewandten Versuchsdurchführungen auch die Positivkontrollen ohne Signal geblieben sind, scheint es sich um ein methodisches Problem zu handeln. Das Ausbleiben des Caspase-3 Signals auf den Kolongewebeschnitten heißt also nicht automatisch, dass die Signale des TUNEL-Assays auf Nekrose zurückzuführen sind. Um zu überprüfen, ob die Signale des TUNEL-Assays einen apoptotischen Ursprung haben, wurde versucht, aktivierte Caspase-3 im Westernblot zu detektieren. Es gelang, in Überständen von lysierten Kolongewebe aktivierte Caspase-3 nachzuweisen (Abb. 4.13). In Lysaten des Kolongewebes von Mäusen, die Normalfutter erhielten, war ein deutliches Signal der Caspase-3 nachweisbar, während in Lysaten der 10% AC-Gruppe kein Signal und in Proben der gHB-Gruppe nur ein schwaches bzw. kein Signal erkennbar war. Aufgrund dieses Westernblots kann man die Ergebnisse des TUNEL-Assays wohl doch so deuten, dass gHB und AC Apoptose in Epithelzellen des Kolongewebes verhindern und nicht Nekrose.

Die Reduktion der Anzahl der apoptotischen Epithelzellen kann auch ein Grund für den beobachteten Rückgang der pro-inflammatorischen Zytokine sein. Unter physiologischen Bedingungen besteht ein Gleichgewicht zwischen der Neubildung von intestinalen Epithelzellen und dem Verlust der Zellen durch mechanische Abreibungen und Apoptose. Eine Zerstörung der epithelialen Barriere, welche in Zusammenhang mit CED diskutiert wird, bewirkt ein gesteigertes Eindringen schädlicher luminaler Bestandteile und führt zur

Aktivierung von GALT (177). Indem AC die Apoptose von Epithelzellen und damit den Barrierverlust verhindern, wird auch die intestinale Entzündung bei der chronischen DSS-Colitis reduziert.

### 5.3. Einfluss von AC auf humane Makrophagen

Neben den *in vivo* Experimenten wurde der Einfluss der AC auch *in vitro* an der humanen Makrophagenzelllinie MM6 untersucht. Die Anwesenheit des AC-Extraktes bewirkte in den gestressten Zellen eine dosisabhängige Reduktion der Zellaktivierung, was sich in einer Abnahme der IL-8 Sekretion zeigte. Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit TNF, LPS oder IL-1 $\beta$  ließ keinen Schluss auf einen bestimmten durch AC beeinflussten Signalweg erkennen (Abb. 4.1). Auch in anderen Zellen konnte der Einfluss von Beerenextrakten oder speziell ihrer AC beobachtet werden. So bewirkten AC aus Heidelbeeren und Preiselbeeren in geschädigten Endothelzellen einen Rückgang der Entzündung, indem sie die Entzündungsmediatoren IL-8 und MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1) herunterregulieren und so die Invasion von Leukozyten verhindern (178). Zudem konnte in stimulierten humanen Mastzellen ein Rückgang der Genexpression und Produktion von IL-6 und IL-8 nachgewiesen werden. Dieser Effekt ging mit einer Inhibition der Degradation des NF- $\kappa$ B-Inhibitorproteins I $\kappa$ B einher (179).

Bei der Messung von IL-8 fiel auf, dass die prozentuale Rückgangsrate der Sekretion in den verschiedenen Ansätzen in etwa gleich ist und somit nur von der AC-Konzentration beeinflusst wird (Tab. 4.1). Ein toxischer Effekt der AC auf MM6-Zellen wurde vermutet. Apoptosemessungen im Durchflusszytometer (Abb. 4.3) und ein Stoffwechselaktivitätstest (Abb. 4.4) konnten allerdings einen Apoptose-bedingten Rückgang von IL-8 bei geringen AC-Konzentrationen ausschließen. Es stellte sich jedoch heraus, dass höhere AC-Konzentrationen durchaus zu Apoptose in den MM6 Zellen führen (Abb. 4.3 C und D). Die antikarzinogene Wirkung von AC ist bekannt. Sie sind in der Lage in verschiedenen Krebszellen Apoptose zu induzieren, weshalb ihr Einsatz bei der Therapie bestimmter Krebsarten diskutiert wird. So konnte unter anderem

gezeigt werden, dass AC aus Kartoffeln bzw. schwarzen Johannisbeeren Apoptose induzieren und so die Zellproliferation in malignen Prostata- bzw. Leukämiezellen verhindern (180;181). Feng und seine Mitarbeiter haben herausgefunden, dass die Apoptose in den Leukämiezellen durch eine vermehrte Bildung von ROS induziert wird. Gleichzeitig führte die Inkubation von AC in peripheren mononukleären Blutzellen nicht zu einer Anreicherung von ROS, so dass ein zytotoxischer Effekt auf diesen Zelltyp ausgeschlossen werden konnte. Es scheint, als wären von der apoptotischen Wirkung nur die Krebszellen betroffen (180). Dass es in dieser Arbeit auch bei den MM6-Zellen zu einer Induktion der Apoptose kam, wird auf die sehr hohen, unphysiologischen AC-Konzentrationen zurückzuführen sein.

Bei geringen AC-Konzentrationen wurde ein Rückgang der IL-8 Sekretion und damit eine geringere Aktivierung der Zellen gemessen. Gleichzeitig wurde mittels des Westernblots eine Induktion der MAP-Kinasen ERK und JNK nachgewiesen (Abb. 4.2). Diese Beobachtungen scheinen konträr, da JNK als Stresskinase bezeichnet wird. Sie ist für die zelluläre Weiterleitung von Reizen, insbesondere von Stresssignalen wie UV-Strahlung, Interleukinen und Chemokinen zuständig. Beide spielen jedoch bei einer Vielzahl physiologischer Prozesse eine wichtige Rolle. Von ERK weiß man, dass es von verschiedenen extrazellulären Signalen aktiviert wird und zelluläre Prozesse reguliert, wie z.B. die Proliferation und die Zelldifferenzierung.

Einige Studien haben gezeigt, dass es durch AC zur induzierten Apoptose kommt. Die MAP-Kinasen p38, JNK und ERK spielen dabei eine Rolle (180;181). Jedoch ist die genaue Signaltransduktion nicht geklärt. So haben verschiedene Arbeitsgruppen eine Caspase-unabhängige Induktion der Apoptose (167;181) und andere eine Caspase-abhängige Apoptose-Induktion beobachtet (182;183). Wegen der Vielzahl an AC und den unterschiedlichen AC-Profilen, die in der Natur vorkommen, ist das Forschungsgebiet der AC sehr komplex. Schon der Austausch eines Substituenten kann ausreichen, um die Eigenschaften der AC zu ändern. Hou und seine Mitarbeiter haben gezeigt, dass von fünf untersuchten Anthocyanidinen nur zwei die COX-2 Expression beeinflussen und die restlichen trotz einer sehr ähnlichen Struktur nicht (184).

Ähnliches konnte bei verschiedenen Beeren beobachtet werden (167). Aufgrund dieser Komplexität ist es nicht verwunderlich, dass andere Arbeitsgruppen eine dosisabhängige Reduktion der Kinasen ERK und JNK nachgewiesen haben (185), während in dieser Arbeit eine Zunahme mit steigender AC-Konzentration beobachtet wurde.

#### **5.4. Einfluss von gHB und AC auf die Expression von CTS**

Ein weiteres Projekt dieser Dissertation war es, die Rolle der Cathepsine (CTS) bei der Gewebeerstörung im Darm näher zu beleuchten. Es sollte unter anderem untersucht werden, ob die Fütterung von gHB bzw. AC die Expressionsrate und damit die gewebeschädigende Wirkung der CTS hemmt. Die Analyse der cDNA aus Kolongewebe von Mäusen mit akuter bzw. chronischer DSS-Colitis mittels Real-Time-PCR mit SYBR-Green beschränkte sich auf die CTS B, D und L.

Es zeigte sich, dass durch die Fütterung von gHB alle drei untersuchten CTS in der akuten Colitis signifikant weniger und in der chronischen Colitis signifikant höher exprimiert werden im Vergleich zu den Kontrolltieren, die Normalfutter erhielten. Dass Beeren bzw. ihre Polyphenole Einfluss auf Enzyme haben, ist bereits bekannt. Unter anderem haben McDougall und seine Mitarbeiter nachgewiesen, dass eine Reihe von Polyphenolen aus Beeren die Aktivität von Proteasen inhibieren (186). Aber auch ihre Wirkung auf die Lipasen wird diskutiert. Aufgrund dieser Beobachtungen wird die inhibierende Wirkung der Polyphenole auf Verdauungsenzyme als eigentlicher Grund für den Erfolg einer Obst- und Gemüsereichen Diät gesehen. Studien zum Einfluss von Beeren auf CTS sind bisher aber noch nicht bekannt.

Auch der AC-Extrakt hatte einen deutlichen Effekt auf die Expression der CTS. Jedoch kam es im Vergleich zu der Gruppe, die Normalfutter bekam, vor allem zu einer Induktion der CTS sowohl in der akuten als auch der chronischen Colitis. Nur in der Gruppe, die 10% AC erhielt, konnte bei der chronischen Colitis eine Reduktion von CTSB und CTSL beobachtet werden. CTSD wurde jedoch fast doppelt so hoch exprimiert, was schon in der chronischen Colitis mit

einer AC-Konzentration von 1% zu beobachten war. Bisher wurde ein Zusammenhang von AC und CTS noch nicht untersucht. Interessanterweise wird die Expression von CTSB und CTSL aber durch Zytokine reguliert. In Lungenepithelzellen konnte beispielsweise die CTSL-Expression und -Proteinsynthese durch IL-6 signifikant gesteigert werden (187) und in Tumorzellen zeigte sich eine erhöhte CTSB-Sekretion durch Stimulation mit IL-8 (188). In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass AC in der chronischen DSS-Colitis eine starke Reduktion der IL-6 Sekretion bewirken (Abb: 4.10 B) und dass 10% AC die Expression von CTSB, aber vor allem von CTSL, stark reduzierten (Abb: 4.14 C). Aufgrund dessen kann man durchaus von einem Zusammenhang der AC und der CTS sprechen. AC werden aber auch mit anderen Proteasen in Verbindung gebracht. In der Tumorforschung gibt es einige Studien, die den Einfluss der AC auf andere gewebeschädigende Enzyme untersucht haben. Es zeigte sich, dass vor allem die Metalloproteasen (MMP) Ziele der AC sind. So wurden durch AC aus schwarzem Reis bzw. aus Maulbeeren die MMP-2, die MMP-9 und die Urokinase gehemmt (189;190). Auch AC aus Heidelbeeren bewirkten eine geringere Aktivität verschiedener MMPs. Der Wirkmechanismus der AC beruht auf einer erhöhten Aktivität des endogenen MMP-Inhibitors TIMP (tissue inhibitor of metalloproteinase). Durch die Regulation der gewebeschädigenden MMPs zeigten die untersuchten Krebszellen ein deutlich geringeres Potential zu metastasieren (191). Neben den MMPs wurden auch lysosomale Proteasen untersucht. Bei Ratten konnte gezeigt werden, dass es durch eine Ischämie im Herzen zu einem Anstieg lysosomaler Enzyme kommt. Die Gabe von Procyanidinen aus Trauben vor Auslösen der Ischämie führte zu einer deutlich geringeren Aktivität der lysosomalen Proteasen, zu denen unter anderen auch CTSD gehört (192).

Auffällig bei der Auswertung der Ergebnisse war, dass sich die CTS bei der Behandlung mit AC in der chronischen Colitis unterschiedlich verhielten. Die 1% AC-Konzentration hatte auf die CTSB und L keinen Einfluss, während die Expression von CTSD deutlich induziert wurde. Die höhere AC-Konzentration führte hingegen zu einer verminderten Expression der CTSB und L und zu einem leichten Anstieg der CTSD-Expression. In diesem Ansatz zeigt sich das

spezifische Verhalten der AC. Bei CTSB und CTSL handelt es sich um Cysteinproteinasen, bei CTSD dagegen um eine Aspartatproteinase.

## 5.5. Hemmung der lysosomalen Cathepsin-Proteasen

In Vorarbeiten dieser Arbeitsgruppe konnte CTSD als differentiell exprimiertes Gen bei CED (40), sowie eine Induktion von CTSB und CTSL in CED-assoziierten Darmentzündungen nachgewiesen werden (146). Zudem wurde gezeigt, dass alle drei untersuchten Cathepsine eine basale Aktivität im murinen Kolongewebe haben (146). Eine von Menzel und Mitarbeitern durchgeführte selektive Hemmung von CTSD bzw. die gemeinsame Inhibition von CTSB und CTSL ergab eine deutliche Besserung der Symptome im Modell der akuten DSS-Colitis (146). Die Bedeutung der Cathepsine B, D und L außerhalb des metabolischen Proteinabbaus zeigte sich in Studien an Knock-out Mäusen. CTSD defiziente Mäuse sterben postnatal ca. am Tag 26 aufgrund massiver intestinaler Nekrosen, Thromboembolien und Lymphopenie (105). CTSB- bzw. CTSL-defiziente Mäuse zeigen nur leichte phänotypische Veränderungen, aber ein simultaner Knock-out führt postnatal innerhalb von 2 bis 4 Wochen aufgrund massiver Atrophien im Gehirn zum Tod der Tiere (96). Eine kombinierte Effektorwirkung wurde vermutet und durch den Erfolg der simultanen Hemmung von CTSB und CTSL auch bestätigt (146).

In dieser Arbeit wurde der Effekt der separaten Inhibition von CTSB und CTSL untersucht, um zu klären, ob auch eine Einzelhemmung therapeutisch interessant ist. Es zeigte sich, dass die Einzelhemmung sowohl von CTSB als auch CTSL eine Besserung der Colitis bewirkte, was sich im histologischen Score, der Kolonlänge und der Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine INF $\gamma$ , TNF und IL-6 widerspiegelte. Der CTSB-Inhibitor CA-074 erwies sich bei allen untersuchten Parametern als etwas effektiver gegenüber dem CTSL-Inhibitor. Die Injektion der Inhibitoren hatte keinen negativen Einfluss auf den histologischen Score und die Kolonlänge in gesunden Mäusen. Jedoch kam es durch den CTSL-Inhibitor Z-Phe-Tyr-Aldehyd zu einem starken Anstieg der pro-



inflammatorischen Zytokine, so dass diese Inhibition für weitere Untersuchungen ausgeschlossen wurde.

Aufgrund des Erfolges der in Vorarbeiten gezeigten CTSD-Inhibition durch Pepstatin A und der in dieser Arbeit nachgewiesenen Besserung der Colitis durch den CTSB-Inhibitor CA-074, wurde der Einfluss dieser beiden Cathepsine bei der chronischen DSS-Colitis untersucht, um einen Bezug zu CED herzustellen. Statt der täglichen Injektion des CTS-Inhibitors über so viele Wochen wurde das Knock-out Modell gewählt. Für CTSB wurden drei Gruppen verwendet: der Wildtyp (+/+), der heterozygote Knock-out (+/-) und der homozygote Knock-out (-/-). Aufgrund der Letalität des homozygoten Knock-outs konnten im Falle von CTSD nur die Wildtypgruppe (+/+) und der heterozygote K.o. (+/-) ausgewertet werden. Interessanterweise konnte man feststellen, dass die Entzündungsparameter mit „zunehmenden Knock-out“ bei CTSB schlechter und bei CTSD besser wurden. Besonders deutlich war der negative Effekt des CTSB Knock-outs anhand des histologischen Scores zu beobachten. Die Zerstörungen des Epithels und die Leukozyteninfiltration waren im Falle des homozygoten Knock-outs fast doppelt so hoch im Vergleich zur Wildtyp-Gruppe. Der positive Effekt des CTSD Knock-outs wurde vor allem anhand der starken Reduktion der Sekretion von TNF sichtbar.

Die Auswertung von CTSD hat gezeigt, dass eine Unterdrückung dieses Cathepsins sowohl in der akuten als auch in der chronischen DSS-Colitis eine Besserung der Colitis-Symptome bewirkte. Die Hemmung von CTSB führte hingegen nur in der akuten, nicht jedoch in der chronischen Colitis zu einer verminderten intestinalen Entzündung. CTSD vermittelt interessanterweise Apoptose, wobei der genaue Mechanismus bisher nicht geklärt ist. Vermutlich wird durch oxidativen Stress die Translokation aus den Lysosomen in das Zytosol ausgelöst, wo CTSD Caspasen aktiviert (193). Es ist bekannt, dass die Apoptose von Epithelzellen bei der Pathogenese und der Aufrechterhaltung der intestinalen Entzündung sowohl bei der chronischen DSS-Colitis, als auch bei CED eine große Bedeutung hat (153). Aufgrund dessen würde eine Hemmung von CTSD und der damit verbundenen Reduzierung der Apoptose bei der Behandlung von CED durchaus sinnvoll sein. Dass es in der chronischen Colitis

bei den CTSB Knock-out Mäusen nicht zu einer Verbesserung der Colitis-Symptome gekommen ist, heißt nicht, dass die Hemmung von CTSB bei CED nicht sinnvoll ist. Die bei der akuten DSS-Colitis verwendeten Inhibitoren können die Zellmembran nicht passieren und verbleiben im Extrazellularraum. Die Hemmung ist dementsprechend nur auf die extrazelluläre, gewebeschädigende Wirkung der Cathepsine, nicht jedoch auf ihre essentiell wichtige intrazelluläre Aktivität beschränkt. Von dem Knock-out sind sowohl die intra- als auch die extrazelluläre Funktion betroffen. Möglicherweise hat die Hemmung der intrazellulären Wirkung von CTSB auch einen negativen Einfluss auf die in der chronischen DSS-Colitis gemessenen Parameter. Die Verwendung von Knock-out-Mäusen scheint daher für die Untersuchung von CTSB bei CED nicht das geeignete Modell zu sein.

Aufgrund dieser Daten könnten die Cathepsine einen neuen Therapieansatz für die Behandlung von CED darstellen. Die Hemmung der extrazellulären Cathepsinaktivität wäre ein alternatives Konzept zur Prävention der mukosalen Gewebeerstörung. Durch die Unfähigkeit der Inhibitoren die Zellmembran zu passieren, bliebe die intrazelluläre essentielle Enzymaktivität erhalten und nur die extrazelluläre gewebeschädigende Cathepsin-Aktivität würde selektiv gehemmt werden.

## **5.6. Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF- $\kappa$ B in intestinalen Makrophagen**

### **5.6.1. Expression von TANK und TBK1**

TANK fungiert als Inhibitor des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B, welcher in Makrophagen der nicht entzündeten Mukosa nicht aktiv ist (59). Es wurde vermutet, dass TANK erst bei der Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen induziert wird. Die Expressionsanalysen von Monozyten und IMAC aus Kontroll- und CED-Patienten zeigten, dass TANK in IMAC tatsächlich stärker exprimiert wird als in Monozyten. Ein Vergleich der TANK-Expression innerhalb der untersuchten IMAC hat gezeigt, dass TANK in Proben von CED-

Patienten stärker exprimiert wird als in IMAC von Kontrollen. TBK1 wirkt der inhibierenden Funktion von TANK entgegen, indem es an den inaktiven TANK/TRAF2-Komplex bindet und damit NF- $\kappa$ B aktiviert. Die Auswertung der TBK1-Expression zeigte jedoch keinen Unterschied zwischen Monozyten und Makrophagen, nur in IMAC von CU-Patienten kam es zur Induktion von TBK1. Die in einem subtraktiven Screen nachgewiesene Induktion von TANK in IMAC im Vergleich zu *in vitro* differenzierten Makrophagen (39) konnte somit bestätigt werden. *In vitro* differenzierte Makrophagen werden aus Monozyten gewonnen und besitzen aufgrund des fehlenden Gewebeverbandes noch Monozyten-Merkmale. Sie exprimieren die für Monozyten typischen Rezeptoren CD14 (LPS-Rezeptor) und CD16 (Fc $\gamma$  III-Rezeptor). Auch mittels Affimetrix GeneChip<sup>®</sup> Arrays, die in unserer Arbeitsgruppe durchgeführt wurden, konnte eine Induktion von TANK gezeigt werden. Allerdings wurde bei diesen Untersuchungen auch eine signifikante Abnahme von TBK1 nachgewiesen (nicht veröffentlicht), was in dieser Arbeit nicht zu beobachten war.

Die Expression von TANK in IMAC bei gleichzeitiger Abwesenheit von TBK1 bewirkt eine Deaktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges. Es ist bekannt, dass NF- $\kappa$ B in IMAC der nicht entzündeten Mukosa inaktiv ist (59). Ein möglicher Grund für diese Regulation ist das Fehlen der *toll-like*-Rezeptoren (TLR) 2 und 4 auf IMAC (38), deren Ligandenbindung zu einer Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges führen würde. Allerdings muss es noch einen anderen, intrazellulären Mechanismus geben, um die Aktivierung dieses Signalweges zu blockieren, da nicht alle Rezeptoren auf IMAC der nicht entzündeten Mukosa herunterreguliert sind. Eine Aktivierung beispielsweise durch TNF, IL-1 bzw. CD-40 ist nach wie vor möglich. TANK könnte bei diesem intrazellulären Mechanismus eine inhibierende Rolle spielen, indem es an TRAF2 bindet. Durch diese Bindung ist die Signalweiterleitung unterbrochen (84). Wenn TBK1 abwesend ist, kann es nicht zur Bildung des aktiven tertiären Komplexes aus TBK1/TANK/TRAF2 kommen und eine Aktivierung der NIK-IKK-Kaskade ist nicht möglich. Folglich wird NF- $\kappa$ B nicht aktiviert (86).

In dieser Arbeit konnte jedoch keine Reduktion der TBK1-Expression beobachtet werden. Möglicherweise reicht eine Induktion von TANK bei gleich

bleibender Expression von TBK1 auch aus, um die Aktivierung von NF- $\kappa$ B in IMAC zu inhibieren.

### **5.6.2. Aktivierung von NF- $\kappa$ B durch TNF**

Wie bereits erwähnt, ist eine Aktivierung von IMAC durch TNF möglich. Nach Bindung von TNF am Rezeptor kommt es zur Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges und folglich auch zur Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins IL-6. Ob dieser Signalweg durch TANK tatsächlich gehemmt wird, sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die IMAC von Kontroll- als auch von CED-Patienten nicht mit einer erhöhten IL-6 Sekretion auf TNF reagierten, während die Stimulation mit TNF in Monozyten zu einem deutlichen Anstieg der IL-6 Produktion führte. Diese Beobachtungen gehen mit den Expressionsdaten von TANK und TBK1 in den unstimulierten IMAC bzw. Monozyten einher. Obwohl TBK1 nicht herunterreguliert wird, reicht die Induktion TANK in IMAC anscheinend aus, um eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B-Signalweges zu verhindern. In Monozyten wird TBK1 ebenfalls nicht reguliert, allerdings wird TANK weniger exprimiert und die aktivierende Wirkung von TBK1 überwiegt.

Bei diesem Experiment wurden neben der IL-6 Konzentration in den Überständen, auch die Auswirkungen der TNF-Stimulation auf die Genexpression von TANK und TBK1 untersucht. Die Stimulation von TNF bewirkte eine leichte Induktion von TANK in IMAC, während es in Monozyten herunterreguliert wurde, was mit dem reaktiveren Verhalten der Monozyten einhergeht. TBK1 wurde hingegen sowohl in IMAC als auch Monozyten stark induziert. Das Verhältnis der Genexpression von TBK1 zu TANK zeigte, dass TBK1 in allen Proben deutlich stärker exprimiert wird als TANK. Laut dieser Daten dürften die IMAC nicht so reaktionsträge sein, sondern müssten genauso auf TNF reagieren wie die Monozyten. Es ist daher anzunehmen, dass bei dieser Regulation ein posttranskriptioneller Mechanismus eine Rolle spielt.

## 6. Zusammenfassung

Die Therapiemöglichkeiten für Patienten mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen sind auch heute noch recht unbefriedigend. Sie gehen häufig mit relevanten Nebenwirkungen einher und vor allem Langzeitbehandlungen sind kritisch. Daher war das Hauptziel dieser Dissertation den Einfluss von getrockneten Heidelbeeren und deren Anthocyanen bei der Behandlung von CED zu untersuchen. Für beide natürlich vorkommenden Substanzen konnten bereits protektive Eigenschaften nachgewiesen werden, die bei der Behandlung einer Colitis nützlich sein könnten. Um die Wirksamkeit der Substanzen bei der Colitis zu testen, wurden beide im Modell der akuten und der chronischen DSS-Colitis in Mäusen eingesetzt. Zusätzlich wurde die Wirkung der AC in einer Makrophagenzelllinie getestet, um mögliche Signalwege zu finden, die durch AC beeinflusst werden.

Ein weiteres Projekt dieser Arbeit untersuchte die Hemmung der Cathepsine. Drei dieser gewebeschädigenden lysosomalen Proteasen (Cathepsin B, D und L) wurden im Modell der akuten bzw. chronischen DSS-Colitis gehemmt.

Weiterhin wurde die Expression der in den NF- $\kappa$ B-Signalweg eingreifenden Proteine TANK und TBK1 in intestinalen Makrophagen im Vergleich zu ihrer Vorstufe den Monozyten untersucht, sowie die daraus resultierende Reaktivität der Zellen.

### 6.1. Einfluss von gHB und AC bei der experimentellen Colitis

Der Einfluss der gHB bzw. der AC wurde im murinen Modell der akuten bzw. chronischen DSS-Colitis untersucht. Dazu wurden die Substanzen unter das Futter gemischt. Es zeigte sich, dass gHB die entzündungsbedingte Kolonverkürzung und die Sekretion von INF $\gamma$  und TNF in der akuten Colitis verhindern. In der chronischen Colitis bewirken sie vor allem eine signifikante Verbesserung der Kolonlänge. Eine AC-Konzentration von 10% im Futter

resultierte in einer deutlichen Besserung des histologischen Scores, der Kolonlänge und einem Rückgang der INF $\gamma$ , TNF und IL-6 Sekretion sowohl bei der akuten als auch der chronischen Colitis. Die geringere 1%ige AC-Konzentration war vergleichbar effektiv bei der Linderung der Colitis-Symptome, jedoch zeigte sie keine Wirkung auf die pro-inflammatorischen Zytokine in der akuten Colitis. Die untersuchte AC-Konzentration von 0,1% bewirkte keine Besserung der Symptome weder in der akuten noch der chronischen Colitis. Anhand eines TUNEL-Assay konnte man in Kolongewebeproben der chronischen Colitis nachweisen, dass gHB und AC die Apoptose in Epithelzellen reduzieren. Aufgrund der Daten sind gHB wahrscheinlich für die Behandlung einer akuten Schädigung oder akuten Enteritis geeignet, während sie für die Therapie von CED eher nicht in Frage kommen. AC hingegen scheinen sowohl für die Behandlung von akuten Schädigungen als auch von CED neue Therapiemöglichkeiten darzustellen.

## **6.2. Einfluss von AC auf die Makrophagenzelllinie MM6**

Anhand der humanen Makrophagenzelllinie MM6 sollte ein möglicher Signalweg gefunden werden, der durch AC reguliert wird und deren anti-entzündliche Wirkung erklärt. Dazu wurden verschiedene Stimulationsansätze durchgeführt und die Zellen gleichzeitig mit verschiedenen AC-Konzentrationen inkubiert. Die Auswertung der IL-8 Sekretion hat keinen bestimmten Signalweg ergeben, jedoch gezeigt, dass es dosisabhängig zur AC-Konzentration zur Reduktion der IL-8 Sekretion kommt. Zudem konnte im Westernblot eine Induktion der MAP-Kinasen ERK und JNK nachgewiesen werden. Aufgrund dieser Daten wurde ein zytotoxischer Effekt vermutet. Apoptosemessungen am Durchflusszytometer und ein Stoffwechselaktivitätstest konnten zeigen, dass AC in höheren Dosierungen Apoptose induzieren. Der Rückgang von IL-8 bei geringeren Dosierungen jedoch auf die anti-entzündlichen Eigenschaften der AC zurückzuführen ist.

### 6.3. Hemmung der Cathepsin-Proteasen

Die Hemmung der gewebeschädigenden Cathepsine stellt einen weiteren möglichen Therapieansatz für die Behandlung von CED dar. Zunächst wurden die Auswirkungen der Hemmung von Cathepsin B bzw. L im Modell der akuten DSS-Colitis untersucht. Die Hemmung wurde durch Injektion eines spezifischen Inhibitors sichergestellt, der die Zellmembran nicht passieren konnte und so nur die extrazellulär schädigende Wirkung der Cathepsine, nicht jedoch ihre essentiellen intrazellulären Eigenschaften inhibierte. Die Effizienz der Hemmung jedes einzelnen Inhibitors wurde anhand der Kolonlänge, des histologischen Scores und der Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine IFN $\gamma$ , TNF und IL-6 analysiert. Es stellte sich heraus, dass die Inhibition von CTSB bei allen untersuchten Parametern etwas effektiver war als die von CTSL. Außerdem kam es durch den CTSL-Inhibitor zu einem Anstieg der Zytokine auch in gesunden Mäusen, so dass CTSL nicht weiter verfolgt wurde. Des Weiteren wurde die Hemmung von CTSB und CTSD (Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe haben bereits eine mögliche Bedeutung von CTSD bei CED nachgewiesen) in der chronischen DSS-Colitis getestet, um einen Bezug zu CED zu schaffen. Dafür wurden Knock-out Mäuse von CTSB bzw. CTSD gezüchtet. Es stellte sich heraus, dass der Knock-out von CTSD eine leichte Besserung der Colitis-Symptome im Vergleich zum Wildtyp bewirkte, während das Ausschalten des CTSB-Gens einen negativen Effekt zur Folge hatte. Anhand der Vordaten zu CTSD und der in dieser Arbeit gezeigten Besserung der chronischen Colitis in Knock-out Tieren stellt die Inhibition von CTSD einen weiteren Therapieansatz für CED-Patienten dar. Die Hemmung von CTSB bewirkte in der akuten Colitis eine Besserung, jedoch zeigte die Hemmung von CTSB in den Knock-out Tieren während der chronischen DSS-Colitis keine Besserung der Colitis-Symptome, so dass anhand dieser Daten zwar die Inhibition von CTSB bei einer akuten Schädigung, jedoch nicht bei einer chronischen Colitis sinnvoll ist.

#### **6.4. Regulation des pro-entzündlichen Faktors NF- $\kappa$ B in IMAC und Monozyten**

TANK und TBK1 spielen bei der Regulation von NF- $\kappa$ B eine Rolle. Mittels Real-time-PCR wurde die Expression in Monozyten und IMAC von Kontroll- und CED-Patienten untersucht. Es zeigte sich, dass TBK1 nicht reguliert wird. TANK hingegen wird in IMAC stärker und in Monozyten weniger exprimiert. Aufgrund dessen ging man davon aus, dass Makrophagen reaktionsträger sind als Monozyten. Tatsächlich konnte diese Annahme durch Stimulation der IMAC und Monozyten mit TNF bestätigt werden. Die Stimulation mit TNF führt über den NF- $\kappa$ B-Signalweg zur Sekretion von IL-6. Dieser Signalweg wird in IMAC anscheinend gehemmt, da keine erhöhte IL-6 Sekretion nachweisbar war. Die Stimulation von Monozyten mit TNF führte jedoch zu einer deutlichen Steigerung der IL-6 Sekretion. Durch die Stimulation mit TNF kam es sowohl in IMAC als auch Monozyten zu einer erhöhten Expression von TANK und TBK1, wobei der Anstieg von TBK1 höher war. Anhand der Expressionsanalysen müssten alle Zellen gleich auf TNF reagieren. Dies konnte aber durch die IL-6 Konzentrationsmessungen nicht bestätigt werden, weshalb ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus in den IMAC vermutet wird.



## 7. Ausblick

Im Rahmen dieser Dissertation konnte mittels eines Mausmodells einer Colitis gezeigt werden, dass AC bei der Behandlung von CED-Patienten eine interessante Therapiemöglichkeit darstellen könnten. Die Fütterung der AC im Modell der chronischen DSS-Colitis führte zu einer deutlichen Besserung der Colitis-Symptome. Das in dieser Arbeit verwendete Modell ist jedoch ein chemisch induziertes Modell, so dass die Wirkung der AC noch in einem weiteren, spontanen Modell wie der IL-10 Knock-out Maus getestet werden sollte. Aufgrund des Caspase-3 Westernblots und des TUNEL-Assays an Kolongewebe wurde gefolgert, dass AC im Colitis-Modell Apoptose in Epithelzellen verhindern. Jedoch ist der Apoptose-spezifische Nachweis von Caspase-3 mittels Immunhistochemie auf Kolongewebe in dieser Arbeit nicht gelungen und sollte durch Optimierung der Methode nachgeholt werden.

Darüber hinaus konnte kein spezifischer Signalweg nachgewiesen werden, der durch AC beeinflusst wird. Durch detailliertere Untersuchungen könnte diese Frage doch noch geklärt werden.

Neben den AC wurde noch ein weiterer Therapieansatz für CED getestet: Die Hemmung der Enzymaktivität der Cathepsine B, D und L. In der akuten DSS-Colitis stellte sich die Hemmung von CTSB als effektiver im Vergleich zu CTSL dar. Auch konnte in Vorarbeiten bereits ein Erfolg durch die Hemmung von CTSD beobachtet werden. Es sollte analysiert werden, ob das gleichzeitige Hemmen von CTSB und CTSD eine Steigerung des Therapieerfolges erzielt. Im Falle der chronischen DSS-Colitis konnte zwar eine Besserung für CTSD defiziente Mäuse gezeigt werden, jedoch führte der Knock-out von CTSB zu einer Verschlechterung der Colitis-Symptome. Ob die Hemmung von CTSB nur für die Behandlung von akuten Schädigungen oder doch auch für CED-Patienten geeignet ist, müsste an einem anderen chronischen Modell getestet werden.

Anhand der Expressionsanalysen von TANK und TBK1 in IMAC und Monozyten nach Stimulation mit TNF müssten beide Zelltypen vergleichbar

reaktiv sein. Die Auswertung der IL-6 ELISA zeigte jedoch, dass die Monozyten deutlich stärker reagieren. Ein posttranskriptioneller Regulationsmechanismus wird vermutet und sollte durch den Nachweis der Proteine TANK und TBK1 bestätigt werden. Zwar konnte in unserer Arbeitsgruppe in ersten Färbungen mittels Immunhistochemie TANK in IMAC aus nicht entzündeten Bereichen nachgewiesen werden, jedoch stehen Nachweise von TANK in IMAC von CED-Patienten und Monozyten noch aus. Da kein anti-TBK1-Antikörper kommerziell zu erwerben ist, muss zunächst ein Antikörper gegen TBK1 generiert werden.

## 8. Literaturverzeichnis

- (1) Feldman RA, Boland CR: The Comprehensive Visual Reference. Gastroenterology and Hepatology 1992; 2(16).
- (2) Booth C, Potten CS: Gut instincts: thoughts on intestinal epithelial stem cells. J Clin Invest 2000; 105(11):1493-9.
- (3) Caspary WF, Strater J: Darmkrankheiten; Klinik, Diagnostik und Therapie. Springer-Verlag 1999.
- (4) Bonen DK, Cho JH: The genetics of inflammatory bowel disease. Gastroenterology 2003; 124(2):521-36.
- (5) Jewell DP: Ulcerative colitis and Crohn's disease--susceptibility genes and clinical patterns. J Gastroenterol 1998; 33(3):458-62.
- (6) Duchmann R: Mukosales Immunsystem im Darm-Immunologische Grundlagen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen und der HIV-induzierten Enteropathie. Magazin Forschung der Universität des Saarlandes 1999; 1:47-64.
- (7) Loftus EV, Jr.: Clinical epidemiology of inflammatory bowel disease: Incidence, prevalence, and environmental influences. Gastroenterology 2004; 126(6):1504-17.
- (8) Hampe J, Heymann K, Kruis W, Raedler A, Folsch UR, Schreiber S: Anticipation in inflammatory bowel disease: a phenomenon caused by an accumulation of confounders. Am J Med Genet 2000; 92(3):178-83.
- (9) Heresbach D, Gulwani-Akolkar B, Lesser M et al.: Anticipation in Crohn's disease may be influenced by gender and ethnicity of the transmitting parent. Am J Gastroenterol 1998; 93(12):2368-72.
- (10) Leong RW, Lau JY, Sung JJ: The epidemiology and phenotype of Crohn's disease in the Chinese population. Inflamm Bowel Dis 2004; 10(5):646-51.
- (11) Zheng JJ, Zhu XS, Huangfu Z, Gao ZX, Guo ZR, Wang Z: Crohn's disease in mainland China: a systematic analysis of 50 years of research. Chin J Dig Dis 2005; 6(4):175-81.
- (12) Binder V, Orholm M: Familial occurrence and inheritance studies in inflammatory bowel disease. Neth J Med 1996; 48(2):53-6.

- (13) Neurath MF, Schurmann G: [Immunopathogenesis of inflammatory bowel diseases]. *Chirurg* 2000; 71(1):30-40.
- (14) Schreiber S: Pathophysiologie der chronisch entzündlichen Darmerkrankungen: Gestörte Homöostase von Entzündungsmediatoren?, Aspekte im Gespräch. *Wissenschaft und Klinik* 1998;(10):9-17.
- (15) Hugot JP, Chamaillard M, Zouali H et al.: Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837):599-603.
- (16) Ogura Y, Bonen DK, Inohara N et al.: A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease. *Nature* 2001; 411(6837):603-6.
- (17) Peltekova VD, Wintle RF, Rubin LA et al.: Functional variants of OCTN cation transporter genes are associated with Crohn disease. *Nat Genet* 2004; 36(5):471-5.
- (18) Stoll M, Corneliussen B, Costello CM et al.: Genetic variation in DLG5 is associated with inflammatory bowel disease. *Nat Genet* 2004; 36(5):476-80.
- (19) Fraser CJ, Ahmad T, Geremia A: Contribution of the novel inflammatory bowel disease gene IL23R to disease susceptibility and phenotype. *Inflamm Bowel Dis* 2007;(13):1063-8.
- (20) Tremelling M, Cummings F, Fisher SA et al.: IL23R variation determines susceptibility but not disease phenotype in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 2007; 132(5):1657-64.
- (21) Klein I, Reif S, Farbstein H, Halak A, Gilat T: Preillness non dietary factors and habits in inflammatory bowel disease. *Ital J Gastroenterol Hepatol* 1998; 30(3):247-51.
- (22) Russel MG, Volovics A, Schoon EJ et al.: Inflammatory bowel disease: is there any relation between smoking status and disease presentation? European Collaborative IBD Study Group. *Inflamm Bowel Dis* 1998; 4(3):182-6.
- (23) Satsangi J, Grootcholten C, Holt H, Jewell DP: Clinical patterns of familial inflammatory bowel disease. *Gut* 1996; 38(5):738-41.
- (24) Aderem A, Ulevitch RJ: Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 2000; 406(6797):782-7.
- (25) Janeway C, Travers P: *Immunobiology* 2001; 5.

- (26) Schreiter K: Bedeutung von Gp96 für die mukosale Toleranzentwicklung und bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen. Dissertation 2005.
- (27) Aderem A, Underhill DM: Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev Immunol* 1999; 17:593-623.
- (28) Fraser IP, Koziel H, Ezekowitz RA: The serum mannose-binding protein and the macrophage mannose receptor are pattern recognition molecules that link innate and adaptive immunity. *Semin Immunol* 1998; 10(5):363-72.
- (29) Bonta IL, Ben Efraim S: Involvement of inflammatory mediators in macrophage antitumor activity. *J Leukoc Biol* 1993; 54(6):613-26.
- (30) Fanger MW, Shen L, Graziano RF, Guyre PM: Cytotoxicity mediated by human Fc receptors for IgG. *Immunol Today* 1989; 10(3):92-9.
- (31) Andreesen R, Picht J, Lohr GW: Primary cultures of human blood-born macrophages grown on hydrophobic teflon membranes. *J Immunol Methods* 1983; 56(3):295-304.
- (32) Andus T, Rogler G, Daig R: The role of macrophages, Inflammatory Bowel Disease. Kluwer Academic Publisher 1995;281-97.
- (33) Clarkson SB, Ory PA: CD16. Developmentally regulated IgG Fc receptors on cultured human monocytes. *J Exp Med* 1988; 167(2):408-20.
- (34) Grimm MC, Pavli P, Van de PE, Doe WF: Evidence for a CD14+ population of monocytes in inflammatory bowel disease mucosa--implications for pathogenesis. *Clin Exp Immunol* 1995; 100(2):291-7.
- (35) Mahida YR, Patel S, Gionchetti P, Vaux D, Jewell DP: Macrophage subpopulations in lamina propria of normal and inflamed colon and terminal ileum. *Gut* 1989; 30(6):826-34.
- (36) Malizia G, Calabrese A, Cottone M et al.: Expression of leukocyte adhesion molecules by mucosal mononuclear phagocytes in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1991; 100(1):150-9.
- (37) Rogler G, Hausmann M, Vogl D et al.: Isolation and phenotypic characterization of colonic macrophages. *Clin Exp Immunol* 1998; 112(2):205-15.
- (38) Hausmann M, Kiessling S, Mestermann S et al.: Toll-like receptors 2 and 4 are up-regulated during intestinal inflammation. *Gastroenterology* 2002; 122(7):1987-2000.

- (39) Hausmann M, Spottl T, Andus T et al.: Subtractive screening reveals up-regulation of NADPH oxidase expression in Crohn's disease intestinal macrophages. *Clin Exp Immunol* 2001; 125(1):48-55.
- (40) Hausmann M, Obermeier F, Schreiter K et al.: Cathepsin D is up-regulated in inflammatory bowel disease macrophages. *Clin Exp Immunol* 2004; 136(1):157-67.
- (41) Akira S, Takeda K, Kaisho T: Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2001; 2(8):675-80.
- (42) Takeda K, Akira S: Microbial recognition by Toll-like receptors. *J Dermatol Sci* 2004; 34(2):73-82.
- (43) Philpott DJ, Yamaoka S, Israel A, Sansonetti PJ: Invasive *Shigella flexneri* activates NF-kappa B through a lipopolysaccharide-dependent innate intracellular response and leads to IL-8 expression in epithelial cells. *J Immunol* 2000; 165(2):903-14.
- (44) Rogler G, Andus T: Cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Surg* 1998; 22(4):382-9.
- (45) Schreiber S, Heinig T, Thiele HG, Raedler A: Immunoregulatory role of interleukin 10 in patients with inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 1995; 108(5):1434-44.
- (46) Andus TDR, Vogl D: Imbalance of the interleukin 1 system in colonic mucosa. *Gut* 1997;(41):651-7.
- (47) Casini-Raggi V, Kam L, Chong YJ, Fiocchi C, Pizarro TT, Cominelli F: Mucosal imbalance of IL-1 and IL-1 receptor antagonist in inflammatory bowel disease. A novel mechanism of chronic intestinal inflammation. *J Immunol* 1995; 154(5):2434-40.
- (48) Dionne S, D'Agata ID, Hiscott J, Vanounou T, Seidman EG: Colonic explant production of IL-1 and its receptor antagonist is imbalanced in inflammatory bowel disease (IBD). *Clin Exp Immunol* 1998; 112(3):435-42.
- (49) West GA, Matsuura T, Levine AD, Klein JS, Fiocchi C: Interleukin 4 in inflammatory bowel disease and mucosal immune reactivity. *Gastroenterology* 1996; 110(6):1683-95.
- (50) Andus T, Targan SR, Deem R, Toyoda H: Measurement of tumor necrosis factor alpha mRNA in small numbers of cells by quantitative polymerase chain reaction. *Reg Immunol* 1993; 5(1):11-7.
- (51) Braegger CP, Nicholls S, Murch SH, Stephens S, MacDonald TT: Tumour necrosis factor alpha in stool as a marker of intestinal inflammation. *Lancet* 1992; 339(8785):89-91.

- (52) Gross V, Andus T, Caesar I, Roth M, Scholmerich J: Evidence for continuous stimulation of interleukin-6 production in Crohn's disease. *Gastroenterology* 1992; 102(2):514-9.
- (53) Maeda M, Watanabe N, Neda H et al.: Serum tumor necrosis factor activity in inflammatory bowel disease. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 1992; 14(3):451-61.
- (54) Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ: High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis. *Gut* 1991; 32(12):1531-4.
- (55) Murata Y, Ishiguro Y, Itoh J, Munakata A, Yoshida Y: The role of proinflammatory and immunoregulatory cytokines in the pathogenesis of ulcerative colitis. *J Gastroenterol* 1995; 30 Suppl 8:56-60.
- (56) Reimund JM, Wittersheim C, Dumont S et al.: Mucosal inflammatory cytokine production by intestinal biopsies in patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *J Clin Immunol* 1996; 16(3):144-50.
- (57) Nielsen OH, Elmgreen J, Ahnfelt-Ronne I: Serum interferon activity in inflammatory bowel disease. Arachidonic acid release and lipoxygenation activated by alpha-class interferon in human neutrophils. *Inflammation* 1988; 12(2):169-79.
- (58) Rogler G, Hausmann M, Spottl T et al.: T-cell co-stimulatory molecules are upregulated on intestinal macrophages from inflammatory bowel disease mucosa. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 1999; 11(10):1105-11.
- (59) Rogler G, Brand K, Vogl D et al.: Nuclear factor kappaB is activated in macrophages and epithelial cells of inflamed intestinal mucosa. *Gastroenterology* 1998; 115(2):357-69.
- (60) Sen R, Baltimore D: Multiple nuclear factors interact with the immunoglobulin enhancer sequences. *Cell* 1986; 46(5):705-16.
- (61) Messer G, Rupec RA: [Nuclear factor kappa B (NF-kappa B). II. Pathophysiologic meaning]. *Hautarzt* 2001; 52(8):746-52.
- (62) Li X, Stark GR: NFkappaB-dependent signaling pathways. *Exp Hematol* 2002; 30(4):285-96.
- (63) Pahl HL: Activators and target genes of Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* 1999; 18(49):6853-66.
- (64) Mercurio F, Murray BW, Shevchenko A et al.: IkappaB kinase (IKK)-associated protein 1, a common component of the heterogeneous IKK complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19(2):1526-38.

- (65) Rothwarf DM, Zandi E, Natoli G, Karin M: IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature* 1998; 395(6699):297-300.
- (66) Yamaoka S, Courtois G, Bessia C et al.: Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell* 1998; 93(7):1231-40.
- (67) Zandi E, Karin M: Bridging the gap: composition, regulation, and physiological function of the IkappaB kinase complex. *Mol Cell Biol* 1999; 19(7):4547-51.
- (68) Lee FS, Peters RT, Dang LC, Maniatis T: MEKK1 activates both IkappaB kinase alpha and IkappaB kinase beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(16):9319-24.
- (69) Malinin NL, Boldin MP, Kovalenko AV, Wallach D: MAP3K-related kinase involved in NF-kappaB induction by TNF, CD95 and IL-1. *Nature* 1997; 385(6616):540-4.
- (70) Nakano H, Shindo M, Sakon S et al.: Differential regulation of IkappaB kinase alpha and beta by two upstream kinases, NF-kappaB-inducing kinase and mitogen-activated protein kinase/ERK kinase-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95(7):3537-42.
- (71) Nemoto S, DiDonato JA, Lin A: Coordinate regulation of IkappaB kinases by mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1 and NF-kappaB-inducing kinase. *Mol Cell Biol* 1998; 18(12):7336-43.
- (72) Zhao Q, Lee FS: Mitogen-activated protein kinase/ERK kinase kinases 2 and 3 activate nuclear factor-kappaB through IkappaB kinase-alpha and IkappaB kinase-beta. *J Biol Chem* 1999; 274(13):8355-8.
- (73) Brown RT, Ades IZ, Nordan RP: An acute phase response factor/NF-kappa B site downstream of the junB gene that mediates responsiveness to interleukin-6 in a murine plasmacytoma. *J Biol Chem* 1995; 270(52):31129-35.
- (74) Baldwin AS, Jr.: The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu Rev Immunol* 1996; 14:649-83.
- (75) Ito CY, Kazantsev AG, Baldwin AS, Jr.: Three NF-kappa B sites in the I kappa B-alpha promoter are required for induction of gene expression by TNF alpha. *Nucleic Acids Res* 1994; 22(18):3787-92.
- (76) Le Bail O, Schmidt-Ullrich R, Israel A: Promoter analysis of the gene encoding the I kappa B-alpha/MAD3 inhibitor of NF-kappa B: positive regulation by members of the rel/NF-kappa B family. *EMBO J* 1993; 12(13):5043-9.



- (77) Sun SC, Ganchi PA, Ballard DW, Greene WC: NF-kappa B controls expression of inhibitor I kappa B alpha: evidence for an inducible autoregulatory pathway. *Science* 1993; 259(5103):1912-5.
- (78) Arch RH, Gedrich RW, Thompson CB: Tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs)--a family of adapter proteins that regulates life and death. *Genes Dev* 1998; 12(18):2821-30.
- (79) Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV: TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1. *Nature* 1996; 383(6599):443-6.
- (80) Nakano H, Oshima H, Chung W et al.: TRAF5, an activator of NF-kappaB and putative signal transducer for the lymphotoxin-beta receptor. *J Biol Chem* 1996; 271(25):14661-4.
- (81) Rothe M, Sarma V, Dixit VM, Goeddel DV: TRAF2-mediated activation of NF-kappa B by TNF receptor 2 and CD40. *Science* 1995; 269(5229):1424-7.
- (82) Song HY, Regnier CH, Kirschning CJ, Goeddel DV, Rothe M: Tumor necrosis factor (TNF)-mediated kinase cascades: bifurcation of nuclear factor-kappaB and c-jun N-terminal kinase (JNK/SAPK) pathways at TNF receptor-associated factor 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94(18):9792-6.
- (83) Cheng G, Baltimore D: TANK, a co-inducer with TRAF2 of TNF- and CD 40L-mediated NF-kappaB activation. *Genes Dev* 1996; 10(8):963-73.
- (84) Rothe M, Xiong J, Shu HB, Williamson K, Goddard A, Goeddel DV: I-TRAF is a novel TRAF-interacting protein that regulates TRAF-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(16):8241-6.
- (85) Kaye KM, Devergne O, Harada JN et al.: Tumor necrosis factor receptor associated factor 2 is a mediator of NF-kappa B activation by latent infection membrane protein 1, the Epstein-Barr virus transforming protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93(20):11085-90.
- (86) Pomerantz JL, Baltimore D: NF-kappaB activation by a signaling complex containing TRAF2, TANK and TBK1, a novel IKK-related kinase. *EMBO J* 1999; 18(23):6694-704.
- (87) Nomura F, Kawai T, Nakanishi K, Akira S: NF-kappaB activation through IKK-i-dependent I-TRAF/TANK phosphorylation. *Genes Cells* 2000; 5(3):191-202.
- (88) Shimada T, Kawai T, Takeda K et al.: IKK-i, a novel lipopolysaccharide-inducible kinase that is related to IkappaB kinases. *Int Immunol* 1999; 11(8):1357-62.

- (89) Pender SL, Lionetti P, Murch SH, Wathan N, MacDonald TT: Proteolytic degradation of intestinal mucosal extracellular matrix after lamina propria T cell activation. *Gut* 1996; 39(2):284-90.
- (90) Heuschkel RB, MacDonald TT, Monteleone G, Bajaj-Elliott M, Smith JA, Pender SL: Imbalance of stromelysin-1 and TIMP-1 in the mucosal lesions of children with inflammatory bowel disease. *Gut* 2000; 47(1):57-62.
- (91) Bailey CJ, Hembry RM, Alexander A, Irving MH, Grant ME, Shuttleworth CA: Distribution of the matrix metalloproteinases stromelysin, gelatinases A and B, and collagenase in Crohn's disease and normal intestine. *J Clin Pathol* 1994; 47(2):113-6.
- (92) Saarialho-Kere UK, Vaalamo M, Puolakkainen P, Airola K, Parks WC, Karjalainen-Lindsberg ML: Enhanced expression of matrilysin, collagenase, and stromelysin-1 in gastrointestinal ulcers. *Am J Pathol* 1996; 148(2):519-26.
- (93) Briozzo P, Badet J, Capony F et al.: MCF7 mammary cancer cells respond to bFGF and internalize it following its release from extracellular matrix: a permissive role of cathepsin D. *Exp Cell Res* 1991; 194(2):252-9.
- (94) Rochefort H: Biological and clinical significance of cathepsin D in breast cancer. *Acta Oncol* 1992; 31(2):125-30.
- (95) Yamaguchi N, Chung SM, Shiroeda O, Koyama K, Imanishi J: Characterization of a cathepsin L-like enzyme secreted from human pancreatic cancer cell line HPC-YP. *Cancer Res* 1990; 50(3):658-63.
- (96) Guicciardi ME, Deussing J, Miyoshi H et al.: Cathepsin B contributes to TNF-alpha-mediated hepatocyte apoptosis by promoting mitochondrial release of cytochrome c. *J Clin Invest* 2000; 106(9):1127-37.
- (97) Ishibashi O, Kurokawa T, Kumegawa M: Breast cancer cells express cathepsins B und L but not cathepsins K or H. *Cancer Biochem Biophys* 1999;(17):69-78.
- (98) Kakegawa H, Nikawa T, Tagami K et al.: Participation of cathepsin L on bone resorption. *FEBS Lett* 1993; 321(2-3):247-50.
- (99) Liaudet-Coopman E, Beaujouin M, Derocq D: Cathepsin D: newly discovered functions of a long-standing aspartic protease in cancer and apoptosis. *Cancer Lett* 2006;(237):167-79.
- (100) Mason RW, Johnson DA, Barrett AJ, Chapman HA: Elastinolytic activity of human cathepsin L. *Biochem J* 1986; 233(3):925-7.

- (101) Eijan AM, Sandes EO, Riveros MD et al.: High expression of cathepsin B in transitional bladder carcinoma correlates with tumor invasion. *Cancer* 2003; 98(2):262-8.
- (102) Frohlich E, Schlagenhauff B, Mohrle M, Weber E, Klessen C, Rassner G: Activity, expression, and transcription rate of the cathepsins B, D, H, and L in cutaneous malignant melanoma. *Cancer* 2001; 91(5):972-82.
- (103) Sinha AA, Quast BJ, Wilson MJ et al.: Prediction of pelvic lymph node metastasis by the ratio of cathepsin B to stefin A in patients with prostate carcinoma. *Cancer* 2002; 94(12):3141-9.
- (104) Galandiuk S, Miseljc S, Yang AR, Early M, McCoy MD, Wittliff JL: Expression of hormone receptors, cathepsin D, and HER-2/neu oncoprotein in normal colon and colonic disease. *Arch Surg* 1993; 128(6):637-42.
- (105) Saftig P, Hetman M, Schmahl W et al.: Mice deficient for the lysosomal proteinase cathepsin D exhibit progressive atrophy of the intestinal mucosa and profound destruction of lymphoid cells. *EMBO J* 1995; 14(15):3599-608.
- (106) Yu BP: Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev* 1994; 74(1):139-62.
- (107) Flohe L, Beckmann R, Giertz H: Oxygen-centered free radicals as mediators of inflammation. Academic Press 1985;403-36.
- (108) Lih-Brody L, Powell SR, Collier KP et al.: Increased oxidative stress and decreased antioxidant defenses in mucosa of inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci* 1996; 41(10):2078-86.
- (109) Mulder TP, Verspaget HW, Janssens AR, de Bruin PA, Pena AS, Lamers CB: Decrease in two intestinal copper/zinc containing proteins with antioxidant function in inflammatory bowel disease. *Gut* 1991; 32(10):1146-50.
- (110) Koch TR, Yuan LX, Stryker SJ, Ratliff P, Telford GL, Opara EC: Total antioxidant capacity of colon in patients with chronic ulcerative colitis. *Dig Dis Sci* 2000; 45(9):1814-9.
- (111) Martensson J, Jain A, Meister A: Glutathione is required for intestinal function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1990; 87(5):1715-9.
- (112) Ardite E, Panes J, Miranda M et al.: Effects of steroid treatment on activation of nuclear factor kappaB in patients with inflammatory bowel disease. *Br J Pharmacol* 1998; 124(3):431-3.

- (113) Conner EM, Brand S, Grisham MB: Inhibition of chronic granulomatous colitis by a selective proteasome inhibitor: antagonist of nuclear transcription factor kappa B activation. *Gastroenterology* 1996;(110).
- (114) Neurath MF, Pettersson S, Meyer zum Buschenfelde KH, Strober W: Local administration of antisense phosphorothioate oligonucleotides to the p65 subunit of NF-kappa B abrogates established experimental colitis in mice. *Nat Med* 1996; 2(9):998-1004.
- (115) Hoffmann JC, Preiss JC, Autschbach F et al.: [Clinical practice guideline on diagnosis and treatment of Crohn's disease]. *Z Gastroenterol* 2008; 46(9):1094-146.
- (116) Colombel JF, Sandborn WJ, Rutgeerts P et al.: Adalimumab for maintenance of clinical response and remission in patients with Crohn's disease: the CHARM trial. *Gastroenterology* 2007; 132(1):52-65.
- (117) Hanauer SB, Feagan BG, Lichtenstein GR et al.: Maintenance infliximab for Crohn's disease: the ACCENT I randomised trial. *Lancet* 2002; 359(9317):1541-9.
- (118) Present DH, Rutgeerts P, Targan S et al.: Infliximab for the treatment of fistulas in patients with Crohn's disease. *N Engl J Med* 1999; 340(18):1398-405.
- (119) Mazza G, Miniati E: Anthocyanins in fruits, vegetables and grains. CRC Press Inc 1993;85-7.
- (120) Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R: Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003; 64(5):923-33.
- (121) Halliwell B, Rafter J, Jenner A: Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not? *Am J Clin Nutr* 2005; 81(1 Suppl):268S-76S.
- (122) Yan X, Murphy BT, Hammond GB, Vinson JA, Neto CC: Antioxidant activities and antitumor screening of extracts from cranberry fruit (*Vaccinium macrocarpon*). *J Agric Food Chem* 2002; 50(21):5844-9.
- (123) Weisel T, Baum M, Eisenbrand G et al.: An anthocyanin/polyphenolic-rich fruit juice reduces oxidative DNA damage and increases glutathione level in healthy probands. *Biotechnol J* 2006; 1(4):388-97.
- (124) Frankel EN, Kanner J, German JB, Parks E, Kinsella JE: Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *Lancet* 1993; 341(8843):454-7.
- (125) Das S, Santani DD, Dhalla NS: Experimental evidence for the cardioprotective effects of red wine. *Exp Clin Cardiol* 2007; 12(1):5-10.

- (126) Hou DX, Tong X, Terahara N, Luo D, Fujii M: Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Arch Biochem Biophys* 2005; 440(1):101-9.
- (127) Chen D, Daniel KG, Chen MS, Kuhn DJ, Landis-Piwowar KR, Dou QP: Dietary flavonoids as proteasome inhibitors and apoptosis inducers in human leukemia cells. *Biochem Pharmacol* 2005; 69(10):1421-32.
- (128) Nohynek LJ, Alakomi HL, Kahkonen MP et al.: Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr Cancer* 2006; 54(1):18-32.
- (129) Boniface R, Robert AM: [Effect of anthocyanins on human connective tissue metabolism in the human]. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 1996; 209(6):368-72.
- (130) Nakaishi H, Matsumoto H, Tominaga S, Hirayama M: Effects of black current anthocyanoside intake on dark adaptation and VDT work-induced transient refractive alteration in healthy humans. *Altern Med Rev* 2000; 5(6):553-62.
- (131) Galli RL, Bielinski DF, Szprengiel A, Shukitt-Hale B, Joseph JA: Blueberry supplemented diet reverses age-related decline in hippocampal HSP70 neuroprotection. *Neurobiol Aging* 2006; 27(2):344-50.
- (132) Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA et al.: Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999; 19(18):8114-21.
- (133) Xia M, Ling W, Zhu H et al.: Anthocyanin prevents CD40-activated proinflammatory signaling in endothelial cells by regulating cholesterol distribution. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27(3):519-24.
- (134) Meloni F, Ballabio P, Gorrini M et al.: Effects of 3'-hydroxyfarrerol (IdB 1031), a novel flavonoid agent, on phagocyte products. *Inflammation* 1995; 19(6):689-99.
- (135) Tsoyi K, Park HB, Kim YM et al.: Anthocyanins from black soybean seed coats inhibit UVB-induced inflammatory cyclooxygenase-2 gene expression and PGE2 production through regulation of the nuclear factor-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. *J Agric Food Chem* 2008; 56(19):8969-74.
- (136) Osman N, Adawi D, Ahrne S, Jeppsson B, Molin G: Probiotics and blueberry attenuate the severity of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis. *Dig Dis Sci* 2008; 53(9):2464-73.

- (137) Wright P&S: The contrast: Or Scotland as it was in the year 1745 and Scotland in the year 1819. Bloomsbury and J Dick & Co, Edinburgh 1825; 148-9.
- (138) Hunnius: Hunnius Pharmazeutisches Wörterbuch. Walter Gruyter Verlag Berlin 1998; 8. Auflage.
- (139) Wagner H: Arzneidrogen und ihre Inhaltsstoffe. Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH, Stuttgart 1999; 6. Auflage.
- (140) Anthony JP, Fyfe L, Stewart D, McDougall GJ, Smith HV: The effect of blueberry extracts on *Giardia duodenalis* viability and spontaneous excystation of *Cryptosporidium parvum* oocysts, in vitro. *Methods* 2007; 42(4):339-48.
- (141) Linskens RK, Huijsdens XW, Savelkoul PH, Vandenbroucke-Grauls CM, Meuwissen SG: The bacterial flora in inflammatory bowel disease: current insights in pathogenesis and the influence of antibiotics and probiotics. *Scand J Gastroenterol Suppl* 2001; (234):29-40.
- (142) Neut C, Bulois P, Desreumaux P et al.: Changes in the bacterial flora of the neoterminal ileum after ileocolonic resection for Crohn's disease. *Am J Gastroenterol* 2002; 97(4):939-46.
- (143) Sartor RB: Therapeutic manipulation of the enteric microflora in inflammatory bowel diseases: antibiotics, probiotics, and prebiotics. *Gastroenterology* 2004; 126(6):1620-33.
- (144) Howell AB: Cranberry proanthocyanidins and the maintenance of urinary tract health. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2002; 42(3 Suppl):273-8.
- (145) Puupponen-Pimia R, Nohynek L, Alakomi HL, Oksman-Caldentey KM: The action of berry phenolics against human intestinal pathogens. *Biofactors* 2005; 23(4):243-51.
- (146) Menzel K, Hausmann M, Obermeier F et al.: Cathepsins B, L and D in inflammatory bowel disease macrophages and potential therapeutic effects of cathepsin inhibition in vivo. *Clin Exp Immunol* 2006; 146(1):169-80.
- (147) Bull DM, Bookman MA: Isolation and functional characterization of human intestinal mucosal lymphoid cells. *J Clin Invest* 1977; 59(5):966-74.
- (148) Menzel K: Charakterisierung der Funktion von NOD2/CARD15 für die bakterielle Translokation im Kolon bei Morbus Crohn. Dissertation 2007.
- (149) Ziegler-Heitbrock HW, Thiel E, Futterer A, Herzog V, Wirtz A, Riethmüller G: Establishment of a human cell line (Mono Mac 6) with characteristics of mature monocytes. *Int J Cancer* 1988; 41(3):456-61.

- (150) Steidler L, Hans W, Schotte L et al.: Treatment of murine colitis by *Lactococcus lactis* secreting interleukin-10. *Science* 2000; 289(5483):1352-5.
- (151) Gaudio E, Taddei G, Vetusch A et al.: Dextran sulfate sodium (DSS) colitis in rats: clinical, structural, and ultrastructural aspects. *Dig Dis Sci* 1999; 44(7):1458-75.
- (152) Strater J, Wellisch I, Riedl S et al.: CD95 (APO-1/Fas)-mediated apoptosis in colon epithelial cells: a possible role in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1997; 113(1):160-7.
- (153) Vetusch A, Latella G, Sferra R, Caprilli R, Gaudio E: Increased proliferation and apoptosis of colonic epithelial cells in dextran sulfate sodium-induced colitis in rats. *Dig Dis Sci* 2002; 47(7):1447-57.
- (154) Luhr KM, Nordstrom EK, Low P, Kristensson K: Cathepsin B and L are involved in degradation of prions in GT1-1 neuronal cells. *Neuroreport* 2004; 15(10):1663-7.
- (155) Lynas JF, Hawthorne SJ, Walker B: Development of peptidyl alpha-keto-beta-aldehydes as new inhibitors of cathepsin L--comparisons of potency and selectivity profiles with cathepsin B. *Bioorg Med Chem Lett* 2000; 10(15):1771-3.
- (156) Woo JT, Yamaguchi K, Hayama T et al.: Suppressive effect of N-(benzyloxycarbonyl)-L-phenylalanyl-L-tyrosinal on bone resorption in vitro and in vivo. *Eur J Pharmacol* 1996; 300(1-2):131-5.
- (157) Hendrickson BA, Gokhale R, Cho JH: Clinical aspects and pathophysiology of inflammatory bowel disease. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15(1):79-94.
- (158) Blaschek W, Ebel S: Hagers Handbuch der Drogen und Arzneistoffe. Springer-Verlag Berlin, Heidelberg, New York 2005; 5.Auflage.
- (159) Plein K, Burkard G, Hotz J: [Treatment of chronic diarrhea in Crohn disease. A pilot study of the clinical effect of tannin albuminate and ethacridine lactate]. *Fortschr Med* 1993; 111(7):114-8.
- (160) Ericsson CD: Nonantimicrobial agents in the prevention and treatment of traveler's diarrhea. *Clin Infect Dis* 2005; 41 Suppl 8:S557-S563.
- (161) Hallert C, Kaldma M, Petersson BG: Ispaghula husk may relieve gastrointestinal symptoms in ulcerative colitis in remission. *Scand J Gastroenterol* 1991; 26(7):747-50.
- (162) Galvez J, Rodriguez-Cabezas ME, Zarzuelo A: Effects of dietary fiber on inflammatory bowel disease. *Mol Nutr Food Res* 2005; 49(6):601-8.

- (163) Kanauchi O, Andoh A, Iwanaga T et al.: Germinated barley foodstuffs attenuate colonic mucosal damage and mucosal nuclear factor kappa B activity in a spontaneous colitis model. *J Gastroenterol Hepatol* 1999; 14(12):1173-9.
- (164) Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J, Lorente MD et al.: Dietary fiber down-regulates colonic tumor necrosis factor alpha and nitric oxide production in trinitrobenzenesulfonic acid-induced colitic rats. *J Nutr* 2002; 132(11):3263-71.
- (165) Rodriguez-Cabezas ME, Galvez J, Camuesco D et al.: Intestinal anti-inflammatory activity of dietary fiber (*Plantago ovata* seeds) in HLA-B27 transgenic rats. *Clin Nutr* 2003; 22(5):463-71.
- (166) Videla S, Vilaseca J, Antolin M et al.: Dietary inulin improves distal colitis induced by dextran sodium sulfate in the rat. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(5):1486-93.
- (167) Boivin D, Blanchette M, Barrette S, Moghrabi A, Beliveau R: Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NFkappaB by edible berry juice. *Anticancer Res* 2007; 27(2):937-48.
- (168) Jing P, Bomser JA, Schwartz SJ, He J, Magnuson BA, Giusti MM: Structure-function relationships of anthocyanins from various anthocyanin-rich extracts on the inhibition of colon cancer cell growth. *J Agric Food Chem* 2008; 56(20):9391-8.
- (169) Pedersen CB, Kyle J, Jenkinson AM, Gardner PT, McPhail DB, Duthie GG: Effects of blueberry and cranberry juice consumption on the plasma antioxidant capacity of healthy female volunteers. *Eur J Clin Nutr* 2000; 54(5):405-8.
- (170) Seeram NP, Adams LS, Zhang Y et al.: Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* 2006; 54(25):9329-39.
- (171) MacDonald TT, Hutchings P, Choy MY, Murch S, Cooke A: Tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma production measured at the single cell level in normal and inflamed human intestine. *Clin Exp Immunol* 1990; 81(2):301-5.
- (172) Reinecker HC, Steffen M, Witthoeft T et al.: Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. *Clin Exp Immunol* 1993; 94(1):174-81.



- (173) Powrie F, Leach MW, Mauze S, Menon S, Caddle LB, Coffman RL: Inhibition of Th1 responses prevents inflammatory bowel disease in scid mice reconstituted with CD45RBhi CD4+ T cells. *Immunity* 1994; 1(7):553-62.
- (174) Kojouharoff G, Hans W, Obermeier F et al.: Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(2):353-8.
- (175) Abboud PA, Hake PW, Burroughs TJ et al.: Therapeutic effect of epigallocatechin-3-gallate in a mouse model of colitis. *Eur J Pharmacol* 2008; 579(1-3):411-7.
- (176) Deguchi Y, Andoh A, Inatomi O et al.: Curcumin prevents the development of dextran sulfate Sodium (DSS)-induced experimental colitis. *Dig Dis Sci* 2007; 52(11):2993-8.
- (177) Koh IH, Liberatore AM, Menchaca-Diaz JL et al.: Bacterial translocation, microcirculation injury and sepsis. *Endocr Metab Immune Disord Drug Targets* 2006; 6(2):143-50.
- (178) Youdim KA, McDonald J, Kalt W, Joseph JA: Potential role of dietary flavonoids in reducing microvascular endothelium vulnerability to oxidative and inflammatory insults ( small star, filled). *J Nutr Biochem* 2002; 13(5):282-8.
- (179) Rasheed Z, Akhtar N, Anbazhagan AN, Ramamurthy S, Shukla M, Haqqi TM: Polyphenol-rich pomegranate fruit extract (POMx) suppresses PMACI-induced expression of pro-inflammatory cytokines by inhibiting the activation of MAP Kinases and NF-kappaB in human KU812 cells. *J Inflamm (Lond)* 2009; 6:1.
- (180) Feng R, Ni HM, Wang SY et al.: Cyanidin-3-rutinoside, a natural polyphenol antioxidant, selectively kills leukemic cells by induction of oxidative stress. *J Biol Chem* 2007; 282(18):13468-76.
- (181) Reddivari L, Vanamala J, Chintharlapalli S, Safe SH, Miller JC, Jr.: Anthocyanin fraction from potato extracts is cytotoxic to prostate cancer cells through activation of caspase-dependent and caspase-independent pathways. *Carcinogenesis* 2007; 28(10):2227-35.
- (182) Lo CW, Huang HP, Lin HM, Chien CT, Wang CJ: Effect of Hibiscus anthocyanins-rich extract induces apoptosis of proliferating smooth muscle cell via activation of P38 MAPK and p53 pathway. *Mol Nutr Food Res* 2007; 51(12):1452-60.

- (183) Yeh CT, Yen GC: Induction of apoptosis by the Anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. *J Agric Food Chem* 2005; 53(5):1740-9.
- (184) Hou DX, Yanagita T, Uto T, Masuzaki S, Fujii M: Anthocyanidins inhibit cyclooxygenase-2 expression in LPS-evoked macrophages: structure-activity relationship and molecular mechanisms involved. *Biochem Pharmacol* 2005; 70(3):417-25.
- (185) Xia M, Ling W, Zhu H et al.: Anthocyanin attenuates CD40-mediated endothelial cell activation and apoptosis by inhibiting CD40-induced MAPK activation. *Atherosclerosis* 2009; 202(1):41-7.
- (186) McDougall GJ, Stewart D: The inhibitory effects of berry polyphenols on digestive enzymes. *Biofactors* 2005; 23(4):189-95.
- (187) Gerber A, Welte T, Ansorge S, Buhling F: Expression of cathepsins B and L in human lung epithelial cells is regulated by cytokines. *Adv Exp Med Biol* 2000; 477:287-92.
- (188) Schraufstatter IU, Trieu K, Zhao M, Rose DM, Terkeltaub RA, Burger M: IL-8-mediated cell migration in endothelial cells depends on cathepsin B activity and transactivation of the epidermal growth factor receptor. *J Immunol* 2003; 171(12):6714-22.
- (189) Chen PN, Kuo WH, Chiang CL, Chiou HL, Hsieh YS, Chu SC: Black rice anthocyanins inhibit cancer cells invasion via repressions of MMPs and u-PA expression. *Chem Biol Interact* 2006; 163(3):218-29.
- (190) Chen PN, Chu SC, Chiou HL, Kuo WH, Chiang CL, Hsieh YS: Mulberry anthocyanins, cyanidin 3-rutinoside and cyanidin 3-glucoside, exhibited an inhibitory effect on the migration and invasion of a human lung cancer cell line. *Cancer Lett* 2006; 235(2):248-59.
- (191) Matchett MD, MacKinnon SL, Sweeney MI, Gottschall-Pass KT, Hurta RA: Inhibition of matrix metalloproteinase activity in DU145 human prostate cancer cells by flavonoids from lowbush blueberry (*Vaccinium angustifolium*): possible roles for protein kinase C and mitogen-activated protein-kinase-mediated events. *J Nutr Biochem* 2006; 17(2):117-25.
- (192) Karthikeyan K, Sarala Bai BR, Niranjali DS: Grape seed proanthocyanidins ameliorates isoproterenol-induced myocardial injury in rats by stabilizing mitochondrial and lysosomal enzymes: an in vivo study. *Life Sci* 2007; 81(23-24):1615-21.
- (193) Kagedal K, Johansson U, Ollinger K: The lysosomal protease cathepsin D mediates apoptosis induced by oxidative stress. *FASEB J* 2001; 15(9):1592-4.

## 9. Anhang

Teile dieser Arbeit wurden als Posterbeiträge auf Kongressen oder in wissenschaftlichen Zeitschriften vorgestellt. Die Titel der Beiträge sind im Folgenden aufgelistet.

### Posterbeiträge

1. **H. Piberger**, M. Hausmann, K. Menzel, F. Obermeier, J. Schölmerich, G. Rogler. Cathepsininhibition als Therapieansatz für CED. 113. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM). Wiesbaden (04/2007).
2. **H. Piberger**, M. Hausmann, K. Menzel, F. Obermeier, J. Schoelmerich, G. Rogler. Inhibition of cathepsins as a therapeutical option for Inflammatory bowel diseases (IBD). Digestive Disease Week (DDW)/ American Gastroenterological Association (AGA). Washington DC, USA (05/2007).
3. **H. Piberger**, M. Hausmann, K. Menzel, F. Obermeier, J. Schölmerich, G. Rogler. Inhibition von Cathepsinen als Therapieansatz für CED. 62. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Verdauungs- und Stoffwechselkrankheiten (DGVS). Bochum (09/2007).
4. **H. Piberger**, A. Dreiseitel, A. Oehme, P. Sand, P. Schreier, J. Schölmerich, F. Obermeier, G. Rogler. Anthocyane aus Heidelbeeren als möglicher Therapieansatz für CED. 114. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM). Wiesbaden (04/2008).
5. **H. Piberger**, K. Schreiter, I. Frey, S. Kellermeier, W. Falk, M. Fried, J. Schoelmerich, G. Rogler. Role of TANK for inhibition of TNF induced NFkB activation in intestinal macrophages (IMAC). Digestive Disease

Week (DDW)/ American Gastroenterological Association (AGA). San Diego, USA (05/2008).

6. **H. Piberger**, P. Schreier, A. Oehme, G. Krammer, J. Schölmerich, F. Obermeier, G. Rogler. Heidelbeeren und deren Anthocyane als therapeutische Option für Patienten mit CED. 115. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Innere Medizin (DGIM). Wiesbaden (04/2009).

## Vortrag

**H. Piberger:** Einfluss von Heidelbeeren und Anthocyanen auf die akute und chronische Colitis. Deutsche Arbeitsgemeinschaft chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (DAGED); Mainz (06/2008).

## Originalarbeiten

1. Spoettl T, Hausmann M, Menzel K, **Piberger H**, Herfarth H, Scholmerich J, Bataille F and Rogler G. Role of soluble factors and three-dimensional culture in *in vitro* differentiation of intestinal macrophages. World J. Gastroenterol, 2007; 13(7): 1032-41.
2. Dreiseitel A, Schreier P, Oehme A, Locher S, Rogler G, **Piberger H**, Hajak G, Sand PG. Inhibition of proteasome activity by anthocyanins and anthocyanidins. Biochem Biophys Res Commun, 2008; 372(1): 57-61.
3. Dreiseitel A, Schreier P, Oehme A, Locher S, Rogler G, **Piberger H**, Hajak G, Sand PG. Anthocyanins and anthocyanidins are poor inhibitors of CYP2D6. Methods Find Exp Clin Pharmacol, 2009; 31(1): 3-9.

## Originalarbeiten in Vorbereitung

1. **H. Piberger**, A. Oehme, P. Schreier, A. Dreiseitel, PG. Sand, G. Krammer, C. Hofmann, F. Obermeier, J. Schoelmerich, G. Rogler. Anthocyanins ameliorate experimentell colitis.
2. K. Schreiter, **H. Piberger**, M. Hausmann, UG. Strauch, F. Obermeier, J. Schoelmerich, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler. Upregulation of a mechanism inhibiting NFkB activation in intestinal macrophages.
3. S. Bentz, M. Hausmann, **H. Piberger**, S. Paul, L. Held, W. Falk, F. Obermeier, M. Fried, J. Schölmerich, G. Rogler. Clinic relevance of IgG antibodies against food antigens in Crohn`s disease – A double blind cross-over diet intervention study.

## Danksagung

Zum Gelingen meiner Dissertation haben viele Leute beigetragen, bei denen ich mich an dieser Stelle ganz herzlich bedanken möchte.

Als erstes danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Schölmerich für die Möglichkeit zur Erstellung dieser Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin I des Universitätsklinikums Regensburg.

Ganz besonders möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Dr. phil. Gerhard Rogler bedanken, der mir die Möglichkeit gab, trotz meiner kleinen Tochter, meine Dissertation bei ihm durchzuführen. Auch nach seinem Wechsel nach Zürich ging die Betreuung ohne Schwierigkeiten weiter. Seine wertvolle Hilfe bei Fragen und Problemen, sowie seine Anregungen und Hinweise beim Korrekturlesen haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Vielen Dank!

Ein weiterer Dank gilt meinem Betreuer PD Dr. Thomas Langmann, sowie PD Dr. Florian Obermeier, die mir vor allem bei der Organisation der Arbeit geholfen haben und mir mit hilfreichen Ratschlägen zur Seite standen.

Bei allen Kollegen aus dem Forschungsbau H1 möchte ich mich für die nette und produktive Zusammenarbeit bedanken. Ein ganz herzliches Dankeschön geht dabei vor allem an meine lieben Kollegen aus der AG Rogler/Obermeier. Durch ihre Hilfe an „Großkampftagen“ und die nette und freundschaftliche Atmosphäre war diese Arbeit nicht nur möglich, sondern hat auch richtig Spaß gemacht.

Ein riesengroßes Dankeschön geht an die Maus-Mädels Nadjia und Nicole. Ohne ihre Hilfe wäre diese Arbeit wohl gleich am Anfang gescheitert und ich hätte bei meinen „geliebten“ Tierversuchen noch mehr gelitten.

Vielen Dank auch an Dr. Martin Hausmann für seine Unterstützung vor allem zu Beginn meiner Arbeit und an Dr. Claudia Hofmann für ihre vielen Tipps und zahlreichen Korrekturen während der ganzen Zeit.

Ein weiterer Dank gilt allen Mitarbeitern aus der Chirurgie und Pathologie des Universitätsklinikums Regensburg für die Bereitstellung von primärem Darmgewebe.

Ganz besonders möchte ich meiner Familie danken, ohne deren Unterstützung mein Biologiestudium nicht möglich gewesen- und diese Arbeit nicht entstanden wäre. Ich danke ihnen für ihr stets offenes Ohr und die aufmunternden Worte. Herzlichen Dank an meine Schwiegereltern für ihre spontanen Babysittereinsätze, so dass ich diese Dissertation ohne große Einschränkungen durchführen konnte.

Mein größter Dank geht an Andi – danke für dein Verständnis, deine Geduld, deine Aufmunterungen ....- einfach für alles.

## Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit an Eides statt, dass ich die vorgelegte Dissertation ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Regensburg, 20.07.09

---

(Heidi Piberger)